

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Infecção Hospitalar

Infecção hospitalar (IH), também denominada infecção nosocomial, é a infecção adquirida após a admissão do paciente na Unidade Hospitalar, que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (ANVISA, 2004; CHUNG & LEE 2011).

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) define uma infecção hospitalar como uma condição localizada ou sistêmica resultante de uma reação adversa à presença de um agente infeccioso ou à sua toxina, desde que não haja evidência alguma de que a infecção estava presente ou incubada no momento da admissão para os cuidados primários - *Surveillance definitions - hospital* (CDC-NHSN), Web site (www.cdc.gov/ncidod/dhqp/nhsn.html).

As infecções associadas aos cuidados à saúde podem ser causadas por agentes infecciosos de fonte endógena (pele, nariz, boca, trato intestinal ou vagina) ou exógena (pessoal que presta assistência aos pacientes, os visitantes, dispositivos médicos e o próprio ambiente de cuidados) (HORAN *et al.*, 2008).

Este tipo de infecção agrava a incapacidade funcional do indivíduo e pode levá-lo a estresse emocional, podendo levar a situações que pioram a qualidade de vida, e são, também, uma das principais causas de morte de doentes hospitalizados (VASQUE *et al.*, 1999, CHUNG & LEE 2011). Os custos econômicos a elas associados são consideráveis (DANCHAVIJITR *et al.*, 1992; KIM *et al.*, 2000), em especial pelo aumento da taxa de permanência do paciente (PITTET *et al.*, 1999; GIKAS *et al.*, 1999; RAYMOND & AUJARD, 2000, CHUNG & LEE 2011).

As infecções hospitalares da corrente sanguínea vêm apresentando aumento na incidência em diversas regiões do mundo, principalmente em grandes hospitais, incluindo-se os universitários (GARROUSTE-ORGEAS *et al.*, 2000, CHUNG & LEE 2011).

A presença de microrganismos viáveis no sangue pode levar a um considerável aumento da morbidade e da mortalidade dos indivíduos afetados (WU *et al.*, 2011). A maioria dos episódios sépticos é de origem hospitalar e, às vezes, devido a microrganismos que apresentam grande resistência aos antimicrobianos, com mortalidade bem superior aos episódios que ocorrem na comunidade (WU *et al.*, 2011).

A bacteremia é caracterizada pela presença de bactérias na corrente sanguínea. É uma situação relativamente comum e, geralmente, não produz sintomas. A maioria das bactérias que

penetra na corrente sanguínea é rapidamente removida pelo sistema de defesa do hospedeiro. Algumas vezes, no entanto, a quantidade de bactérias presentes é muito elevada, impossibilitando a sua remoção, e ocorre uma infecção denominada sepse, a qual produz sintomas graves. Em alguns casos, a sepse evolui para uma condição potencialmente letal, denominada choque séptico (BERKOW, 2008; WU *et al.*, 2011). Pacientes com septicemia causada por *Pseudomonas aeruginosa* têm taxa de mortalidade acima de 50% (KONEMAN *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2011).

No período de 1979 a 2000, a incidência de bacteremia nos Estados Unidos aumentou em 8,7% e mudou o padrão epidemiológico, etiológico e clínico destas infecções. Foram observados pacientes em unidades de terapia intensiva (UTIs) apresentam uma incidência desproporcional de infecções nosocomiais da corrente sanguínea, se comparados aos pacientes em outras áreas de internação convencional (MARTIN *et al.*, 2003; MASEDA *et al.*, 2011). Estas unidades têm sido o epicentro da resistência bacteriana aos antimicrobianos (EMORI & GAYNES, 1993; SABATIER, 2009, MASEDA *et al.*, 2011).

O uso de procedimentos invasivos, diagnósticos ou terapêuticos, a contaminação de dispositivos artificiais, a difícil implementação de técnicas básicas de controle de infecção, em muitos casos, e a prevalência de microrganismos resistentes a múltiplas drogas antimicrobianas têm contribuído significativamente para o aumento desta ocorrência. Historicamente, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* são os agentes mais importantes das infecções hospitalares. Pneumonia nosocomial, infecções do trato urinário, infecções de feridas cirúrgicas e infecções da corrente sanguínea têm causado a maioria das doenças e óbitos em pacientes hospitalizados (SABATIER, 2009; MASEDA *et al.*, 2011).

2.2. Bastonetes Gram negativos não fermentadores

Os bastonetes Gram negativos não fermentadores de glicose (BGNNF) são microrganismos aeróbios, que se caracterizam pela incapacidade de utilizar os carboidratos como fonte de energia através da fermentação, degradando-os pela via oxidativa (POLLACK, 2000; NOUÉR, 2005). Essas bactérias estão amplamente distribuídas na natureza, raramente causam infecções comunitárias, sendo relacionadas, predominantemente, às infecções hospitalares (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; KIRIKAE, 2012). Apresentam como características principais: necessidades nutricionais mínimas, tolerância às variações das condições físicas, capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos e a de escapar aos mecanismos de defesa do hospedeiro (ENOCH, 2007; WU *et al.*, 2011; MATSUNAGA, 2012).

A importância clínica dos BGNNF tem aumentado significativamente, devido à gravidade das infecções de que participam e à elevada taxa de morbidade e mortalidade, principalmente em pacientes hospitalizados (BRADLEY *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2011). Esse grupo de microrganismos também apresenta resistência intrínseca a vários antimicrobianos, representando um grande desafio na terapêutica. Dentre os BGNNF, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., são considerados os principais agentes de infecção em pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva (UTI) e queimados (SAIMAN *et al.*, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2011; KIRIKAE, 2012).

2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1.1. Aspectos taxonômicos e características gerais

O gênero *Pseudomonas* foi descrito por Migula em 1894 (ANZAI, 2000; PEIX, 2009). Desde sua descoberta, o gênero foi submetido a numerosas revisões taxonômicas, envolvendo não só o número de espécies incluídas, mas, também, os critérios utilizados para sua definição e delimitação. A variedade de parâmetros utilizados revela a dificuldade e os esforços para a distinção das espécies deste gênero e incluem: a análise da morfologia, da estrutura e da composição da parede celular, do tipo de pigmento, das características nutricionais e metabólicas, da susceptibilidade a diferentes compostos, da patogenicidade para diferentes organismos, da estrutura antigênica e das características genéticas e ecológicas (PALLERONI 2005; PEIX, 2009).

Em 1966, as bactérias do gênero *Pseudomonas* foram classificadas em quatro espécies: *P. fluorescens*, *P. pseudomallei*, *P. acidovorans* e *P. alcaligenes* (STANIER *et al.*, 1966). Na década de 1970, estudos baseados na homologia DNA-rRNA permitiram a reclassificação do gênero em cinco grupos geneticamente distintos (PALLERONI *et al.*, 1973, apud FUENTEFRÍA, 2009). Ainda em 1996, quatro dos cinco grupos homólogos foram reclassificados em novos gêneros: *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Shewanella*, *Rastonia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Acidovorax* e *Brevundimonas*. O gênero *Pseudomonas* ficou no Grupo I, composto pelas espécies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. stutzeri*, *P. monteilli*, *P. oryzae*, *P. luteola*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* e *P. pseudoalcaligenes* (KERSTERS *et al.*, 1996).

Pelas alterações taxonômicas mais recentes, o gênero *Pseudomonas* pertence ao Domínio: BACTERIA, *Phylum*: PROTEOBACTERIA, Classe: GAMMAPROTEOBACTERIA, Ordem: *Pseudomonadales*, Família: *Pseudomonadaceae*, na qual se encontram *P. abietaniphila*, *P. Acidovorans*, *P. Aeruginosa*, *P. Agarici*, *P. Alcaligenes*, *P. alcaliphila*, *P. Aminovorans*, *P.*

Fluorescens, e estando nele incluídas mais, aproximadamente, 200 espécies (<http://www.bacterio.cict.fr/p/pseudomonas.html>).

O gênero *Pseudomonas* abrange bactérias Gram negativas, aeróbias, não fermentadoras, que se movimentam por meio de flagelos polares. É ubiqüitário na natureza, com predileção por ambientes úmidos, razão pela qual, é enquadrado no grupo das bactérias hidrofílicas, podendo infectar diversas espécies de plantas e animais, sendo somente algumas espécies patogênicas para o ser humano (KISKA & GILLIAN, 2003; MURRAY *et al.*, 2006; FRANCO, 2010; WU *et al.*, 2011).

As espécies do gênero apresentam ampla versatilidade metabólica, o que lhes permite a utilização de diversos compostos orgânicos. Suas necessidades nutricionais são bastante simples e, muitas vezes, observa sua presença em água destilada, o que prova a sua mínima necessidade nutricional. No laboratório, o mais simples meio de cultura para crescimento de *Pseudomonas* consiste de acetato como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, crescendo em condições de pH neutro e em temperaturas na faixa mesofílica (MURRAY *et al.*, 2006; FRANCO, 2010).

A espécie *P. aeruginosa* é a mais importante do gênero, tanto pela frequência em infecções diversas quanto pelos seus fatores de virulência. Microscopicamente, este microrganismo é observado em forma de bacilos, com dimensões aproximadas de 0.5-1.0µm de largura e de 1.5-5.0µm de comprimento, movendo-se por um único flagelo polar (POLLACK, 2000; MURRAY *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2008; TODAR, 2008). Em meios de cultivo, apresentam colônias iridescentes, que produzem pigmentos hidrossolúveis difusíveis no meio, tais como a piocianina (Azul), pioverdina (esverdeada), pirrubina (vermelho) e, a menos frequente, piomelanina (marrom) (POLLACK, 2000; NOUÉR 2005; MURRAY *et al.*, 2006; TODAR, 2008).

O oxigênio é o aceptor final de elétrons e a presença da enzima citocromo-oxidase é usada para diferenciar o gênero *Pseudomonas* do gênero *Acinetobacter*. Membros do gênero *Pseudomonas* spp. apresentam metabolismo oxidativo e nunca fermentativo, mas podem crescer na ausência de oxigênio, se o nitrato estiver presente como aceptor de elétrons (KISKA & GILLIAN, 2003; MURRAY *et al.*, 2006).

Estas bactérias têm predileção por ambientes úmidos, e isto é refletido em sua ocorrência natural no solo e na água, e no seu achado em vegetações, superfícies de ambientes hospitalares, distribuída em vários reservatórios ambientais tais como, banheiros, equipamentos de terapia e em soluções desinfetantes. Sua tolerância a uma grande variedade de condições

físicas e sua relativa resistência a agentes antimicrobianos contribuem para o sucesso ecológico observado, no seu eficaz papel como patógeno oportunista e proeminente causador de infecções nosocomiais (KISKA & GILLIAN, 2003; MURRAY *et al.*, 2006; TODAR, 2008).

2.2.1.2. Fatores de virulência

Para que uma infecção por *P. aeruginosa* ocorra, é necessária, geralmente, uma quebra importante nas primeiras linhas de defesas do hospedeiro. Essa bactéria produz diversas substâncias consideradas fatores de virulência, as quais são responsáveis pelo aumento da capacidade de colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro, sendo considerada a espécie mais virulenta entre as bactérias oportunistas Gram negativas não fermentadoras da glicose (NOUÉR, 2005; ENOCH, 2007; KÖHLER *et al.*, 2010).

Para facilitar o estabelecimento da infecção, vários destes fatores de virulência parecem ser regulados por um sistema de sinalização como *quorum sensing*, mecanismo pelo qual uma bactéria individual produz pequenas moléculas difusíveis, que podem ser detectadas por outros microrganismos. Em *P. aeruginosa*, e na maioria das bactérias Gram negativas, essas moléculas são sinal de Acil Homoserina Lactonas (AHLs), moléculas conhecidas como autoindutoras, produzidas pelas células bacterianas responsáveis pela etapa inicial da cascata de sinalização (GONZÁLEZ *et al.*, 2001; JOLY-GUILLOU, 2005; 2009; KÖHLER *et al.*, 2010). Este mecanismo de comunicação permite que as bactérias ajam como uma comunidade na regulação coordenada da expressão gênica. Esta expressão regulada dos genes de virulência parece oferecer à bactéria uma vantagem seletiva sobre as defesas do hospedeiro e, portanto, é importante para a ação patogênica do microrganismo (SMITH *et al.*, 2003; VEESSENMEYER *et al.*, 2009; KÖHLER *et al.*, 2010).

Muitos estudos mostram que *P. aeruginosa* é um microrganismo que consegue se aderir a superfícies bióticas ou abióticas para formar comunidades com outros microrganismos, formando o biofilme. A presença de biofilmes em uma grande variedade de dispositivos médicos tem sido associada a mais de 80% das doenças infecciosas e crônicas inflamatórias (COSTERTON *et al.*, 1999; MULCAHY *et al.*, 2008; AMINI *et al.*, 2011). As bactérias no biofilme diferem de suas contrapartes planctônicas nos genes e proteínas que expressam, resultando em fenótipos diferentes sob vários parâmetros, incluindo a resistência aos antimicrobianos e as alterações induzidas no sistema imunológico humano (COSTERTON *et al.*, 1999; STOODLEY *et al.*, 2002; SAUER, 2003; MULCAHY *et al.*, 2008; AMINI *et al.*, 2011).

A colonização de *P. aeruginosa* envolve aderência às células do hospedeiro, através dos *pili* do tipo IV, também conhecidos como fímbrias, que são apêndices finos, *hairlike*, presentes na

sua superfície e de adesinas não-fimbrias (AHMED *et al.*, 2006; FILLoux, 2011). Os pili são importantes na interação direta da pilina com o tecido receptor, ou podem utilizar subunidades menores, que são responsáveis pelo reconhecimento do receptor e pela sua adesão na célula hospedeira (NOUÉR, 2005; ASIKYAN *et al.*, 2008; FILLoux, 2011).

O flagelo da *P. aeruginosa* é necessário para a sua mobilidade, mas também desempenha papel fundamental na dispersão de biofilme e adesão à superfície das células do hospedeiro (ARORA *et al.*, 1998; GEWIRTZ *et al.*, 2001 JYOT *et al.*, 2011). Durante a infecção, a flagelina, principal componente estrutural do flagelo, é reconhecida pelo receptor Toll-like 5 (TLR5) na superfície das células hospedeiras. Assim como TLR5 é usado pelo hospedeiro como um mecanismo de vigilância para detectar bactérias invasoras, *P. aeruginosa*, por sua vez, desencadeia a resposta imune, induzindo a síntese de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF) e α -interleucinas (IL) IL-6 e IL-8 (ZHANG *et al.*, 2003; RUMBO *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2008; JYOT *et al.*, 2011).

Numerosas bactérias secretam diferentes compostos que têm elevada afinidade pelos íons de ferro, os siderófos (LAMONT *et al.*, 2002; BEN *et al.*, 2011). Esses compostos são secretados por *P. aeruginosa*, sendo a pioverdina e a pioquelina captadores de ferro e, também, reguladores da produção de, pelo menos, três fatores de virulência (exotoxina A, uma endoprotease, e a própria pioverdina, quando necessário), que exercem papel importante na instalação da infecção (LAMONT *et al.*, 2002; MEYER *et al.*, 1996; TAKASE *et al.*, 2000; BEN *et al.*, 2011).

A piocianina é um pigmento azul, produzido por *P. aeruginosa*, que catalisa a produção de superóxido dismutase e peróxido de hidrogênio, formas tóxicas do oxigênio. Na presença de pioquelina, o mais tóxico radical é produzido, o hidroxila, que pode mediar o dano tecidual. Este pigmento também estimula a liberação de interleucina 8 (IL-8), acarretando um aumento da atração de neutrófilos (O'MALLEY *et al.*, 2003; MURRAY *et al.*, 2006; BEN *et al.*, 2011).

A cápsula de polissacarídeo, conhecida como exopolissacarídeo mucóide (alginato), também tem função de aderência, funcionando como mediador de aderência à mucina traqueobrônquica, além de promover resistência parcial a mecanismos de defesa do sistema imune, inibindo a ligação de anticorpos, a fagocitose e a morte intracelular em leucócitos (MAI *et al.*, 1993; MURRAY *et al.*, 2006; BEN *et al.*, 2011). Este polímero é produzido por linhagens que infectam cronicamente pacientes com fibrose cística, e é responsável pelas colônias mucóides observadas em culturas de amostras clínicas obtidas destes pacientes, sendo considerado o

principal determinante de patogenicidade em pacientes acometidos por esta enfermidade (DERETIC *et al.*, 1994 ;MURRAY *et al.*, 2006; BEN *et al.*, 2011).

A capacidade de invadir os tecidos depende da produção de enzimas extracelulares e toxinas que quebram barreiras físicas e danificam células hospedeiras, bem como resistência à fagocitose. Para o estágio invasivo, a produção de protease alcalina, elastase, exotoxina A, exoenzima S, citotoxina, lipase e fosfolipase são os principais produtos extracelulares relacionados ao processo invasivo e de interferência com o sistema imunológico (MURRAY *et al.*, 2006; BEN *et al.*, 2011).

Esta bactéria, além de invasiva, é toxinogênica (POIREL, 2004; YANG *et al.*, 2007), podendo secretar diferentes toxinas extracelulares, além de um conjunto de toxinas que é injetado diretamente nas células hospedeiras. Isso ocorre através do sistema de secreção do tipo III (TTSS) (FRANK, 1999; YANG *et al.*, 2007). Este sistema é importante na patogênese de uma série de modelos de infecções animais (FINCK-BARBANÇON *et al.*, 1997; HOLDER *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2007; VEESENMEYER *et al.*, 2009).

2.2.2. O gênero *Acinetobacter*

2.2.2.1. Aspectos taxonômicos e características gerais

O gênero bacteriano *Acinetobacter* vem sofrendo modificações taxonômicas significativas ao longo dos últimos 30 anos. Seu representante mais importante, a espécie *A. baumannii*, emergiu como um dos mais problemáticos agentes patogênicos para as instituições de cuidados de saúde, no nível mundial (PELEG *et al.*, 2008; ROBINSON *et al.*, 2010). Sua história remonta o início do século XX, quando, em 1911, Beijerinck, um microbiologista holandês, descreveu o *Micrococcus calco-aceticus* isolado do solo (HENRIKSEN, 1973; PELEG *et al.*, 2008; TOWNER, 2009).

Diante das características indefinidas referentes a esta bactéria, nas décadas seguintes, microrganismos semelhantes foram descritos e atribuídos a diferentes gêneros e espécies, incluindo, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Bacteria anitratum*, *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*, *Neisseria winogradskyi* (HENRIKSEN, 1973; SOARES, 2006; PELEG *et al.*, 2008).

Em 1954, Prevot e Brison atribuíram ao gênero a designação de *Acinetobacter* (do grego *Akinetos*, ou seja, imóvel), cujas características eram as de microrganismos às vezes capsulados, aeróbios ou anaeróbios, crescendo facilmente em meios de cultivo simples e apresentando, frequentemente, forma de cocos (PELEG *et al.*, 2008). A generalização do teste

da oxidase e sua aplicação para a distinção do gênero *Acinetobacter* mostrou que as espécies nele incluídas, se apresentavam tanto positivas quanto negativas para este teste. Em 1968, um estudo de taxonomia numérica, conduzido por Baumann e colaboradores, mostrou que as espécies oxidase negativas constituíam um único gênero. Estes achados resultaram no reconhecimento oficial do gênero *Acinetobacter* pela Subcomissão de Taxonomia de *Moraxella* e bactérias afins, em 1971, decidindo, a Subcomissão, que o gênero *Acinetobacter* incluiria somente as linhagens oxidase negativas, compondo uma única espécie, *A. calcoaceticus*. O gênero, a partir desse momento, pertenceria, provisoriamente, à família *Neisseriaceae*, junto aos gêneros *Moraxella*, *Branhamella* e *Nisseria* (LESSEL, 1971).

Estudos posteriores, utilizando hibridização de DNA, contribuíram para o esclarecimento da taxonomia do gênero, ao descrever 21 grupos geno-espécies de *Acinetobacter*. Porém, nos laboratórios clínicos, a identificação deste grupo microbiano continua sendo baseada em testes fenotípicos, o que, muitas vezes, não os distingue bem, sendo a terminologia complexo *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* (que corresponde às genospecies 1, 2, 3 e 13) a mais utilizada. (BOUVET & GRIMONT, 1987; ROSSAU, 1991).

Estudos taxonômicos atuais situam o gênero *Actinobacter* no Domínio: BACTERIA, *Phylum*: PROTEOBACTERIA, *Classe*: GAMMAPROTEOBACTERIA, *Ordem*: PSEUDOMONADALES, *Família*: *Moraxelaceae*, sendo incluídas neste gênero as espécies *A. baumannii*, *A. baylyi*, *A. beijerinckii*, *A. bereziniae*, *A. bauvetii*, *A. calcoaceticus*, *A. gernerii*, *A. guillouiae*, *A. grimontii*, *A. gyllenbergii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lowoffii*, *A. parvus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri*, *A. soli*, *A. tandoli*, *A. tjernbergiae*, *A. towneri*, *A. ursingui*, *A. venetianus* (www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html; EUZÉBY, 2010).

O gênero *Acinetobacter* é constituído por bactérias aeróbias, apresentando metabolismo oxidativo, nunca fermentativo, catalase positiva e reação negativa ao teste de oxidase, característica que pode ser utilizada como teste presuntivo para diferenciá-lo de outros bacilos Gram negativos não fermentadores (BERGOGNE-BEREZIN *et al.*, 1996; OLIVEIRA, 2007; PELEG *et al.*, 2008; MATSUNAGA, 2012).

Estas bactérias, de acordo com características morfológicas, podem ser identificadas presuntivamente como bacilos, durante a fase exponencial de crescimento, e cocobacilos, durante a fase estacionária. Geralmente, são encapsuladas, apresentando-se aos pares, com tamanho variável de 1-1,5µm de diâmetro e 1,5-2,5µm de comprimento. Não esporulam, são imóveis, mas apresentam um movimento vibratório resultante da presença de fímbrias polares (BERGOGNE-BEREZIN *et al.*, 1996; OLIVEIRA, 2007).

Crescem com facilidade em temperatura de 30°C a 35°C em meios de cultivo comuns no laboratório, como ágar MacConkey, ágar Sangue, ágar Trypticaseína de Soja e ágar Mueller-Hinton, alguns crescem em temperatura acima de 40°C, o que permite a diferenciação entre algumas espécies (SOARES, 2006). Em ágar Trypticaseína de Soja, incubadas a 30°C, as colônias são convexas, circulares, lisas, ligeiramente translúcidas ou opacas, mucóides para as estirpes capsuladas e, geralmente, não pigmentadas. Após 48 horas de incubação, as colônias obtidas em ágar sangue de carneiro ou cavalo podem ser hemolíticas (PELEG *et al.*, 2008).

As espécies deste gênero crescem em meios definidos contendo uma única fonte de carbono e podem utilizar sais de amônio e nitrato como fonte de nitrogênio. As suas diferentes espécies não necessitam de outros fatores de crescimento. São consideradas bactérias ubíquas, cujos principais *habitats* são o solo, águas superficiais, plantas, pele saudável dos seres humanos e de outros animais, apresentando a capacidade de sobreviver em locais úmidos e superfícies secas (BERGOGNE-BEREZIN *et al.*, 1996; SEIFERT, *et al.*, 1997; RESENDE, 2009).

Um estudo epidemiológico avaliando a colonização de *Acinetobacter* spp. na pele e mucosas de quarenta pacientes em uma enfermaria de cardiologia, e de quarenta indivíduos sem internação (grupo controle), mostrou a colonização em 30 pacientes (75%) e em 17 membros do grupo controle (42,5%), e o aumento nas taxas de colonização destes pacientes durante a sua permanência no hospital. Contudo, a espécie *A. baumannii*, o patógeno nosocomial mais importante do grupo, foi raramente encontrada na pele humana, tanto nos pacientes internados quanto nos do grupo controle, 1% e 0,5% respectivamente, permanecendo, seu *habitat* natural a ser definido (SEIFERT, *et al.*, 1997; TOWNER, 2009).

Algumas espécies do gênero *Acinetobacter* parecem estar distribuídas amplamente na natureza, como a espécie *A. calcoaceticus*, que é encontrada na água, no solo e nos vegetais; *A. johnsonii*, encontrada na água e no solo, na pele humana, e em fezes humanas; *A. lwoffii* e *A. radioresistens*, encontradas na pele humana. Quanto à espécie *A. baumannii*, pelo menos na Europa, a taxa de portadores sadios na comunidade é bastante baixa. Além disso, embora tenha sido encontrada em amostras de solo em Hong Kong e de produtos hortícolas, no Reino Unido, *A. baumannii* não parece ser um microrganismo típico do ambiente (ANSTEY *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2002; LEUNG *et al.*, 2006; MATSUNAGA, 2012).

2.2.2.2. Fatores de virulência

No passado, o gênero *Acinetobacter* foi considerado um microrganismo de baixa virulência; no entanto, a ocorrência de infecções como a pneumonia fulminante adquirida na

comunidade causada por *Acinetobacter* spp. indica que essas bactérias podem, às vezes, apresentar alta patogenicidade e causar doença invasiva. Estudos sobre fatores de virulência de *Acinetobacter* spp. estão, ainda, numa fase primária, tendo sido descritas características de aderência não específicas, tais como fimbrias, e polissacarídeo capsular (BERGOGNE-BEREZIN *et al.*, 1996; GOEL *et al.*, 2001; VALLENET *et al.*, 2008).

A presença de lipopolissacarídeo (LPS) está envolvida na resistência bacteriana ao complemento do soro humano e age em sinergismo com a cápsula exopolissacarídica. A cápsula exopolissacarídica bloqueia o acesso do complemento à parede celular bacteriana e previne a ativação, por caminhos alternativos do complemento, como foi demonstrado em modelos experimentais de infecções por bactérias Gram negativas. Sabe-se que o exopolissacarídeo é um dos principais fatores de virulência bacterianos, que confere aos que o produzem resistência contra as defesas fagocíticas do hospedeiro (GOEL *et al.*, 2001; JACOBS *et al.*, 2010).

Em amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas de espécimes clínicos, diferentes moléculas sinalizadoras de *quorum-sensing* capazes de ativar N-acil homoserina lactonas (AHLs), como já definidos anteriormente como moléculas autoindutoras produzidas pelas células bacterianas responsáveis pela etapa inicial da cascata de sinalização, mostraram atividade máxima na fase estacionária de crescimento, o que poderia ser um mecanismo central para a auto-indução de múltiplos fatores de virulência (JOLY-GUILLOU, 2005; GONZÁLEZ *et al.*, 2001; 2009).

Embora tenha sido observada a habilidade de *A. baumannii* formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, muitos dos mecanismos moleculares desta formação permanecem não identificados e precisam ser esclarecidos (GADDY & ACTIS, 2009). Esta é uma característica importante na colonização de muitas bactérias patogênicas, facilitando e contribuindo para invasão e resistência a drogas. A formação de biofilme parece envolver uma grande variedade de caminhos que são regulados por *quorum sensing* (VIDAL *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* revelaram que a proteína A da membrana externa da *A. baumannii* (OmpA) desempenha um papel importante na invasão celular do epitélio brônquico, o que pode atribuir a este microrganismo a capacidade de causar pneumonia (CHOI *et al.*, 2005; JACOBS *et al.*, 2010). Já a proteína de membrana externa 38 (Omp38) pode agir como potencial fator de virulência na indução da apoptose de células epiteliais, no estágio inicial da infecção por *A. baumannii* (CHOI *et al.*, 2005).

Alguns autores citam a capacidade de *Acinetobacter* spp. crescer sob condições de deficiência de ferro, sugerindo a presença de sideróforo. Esta bactéria é capaz de expressar grande afinidade por sistemas de captação de ferro compostos por sideróforos (CHOI *et al.*, 2005; JOLY-GUILLOU, 2005; HWA *et al.*, 2010).

2.2.2.3 Aspectos gerais das infecções de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* nas infecções hospitalares

P. aeruginosa é, primariamente, um patógeno nosocomial, que raramente afeta pessoas saudáveis. Já foi mencionado que esta bactéria é considerada uma das principais espécies microbianas envolvidas em infecções nosocomiais, e que sua presença em infecções diversas tem papel de destaque, seja pela frequência, pelo custo ou pela morbi-mortalidade relacionada às estas infecções (BERGOGNE *et al.*, 1996; PADOVEZE *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2011).

Analisando apenas infecções com bacteremia, GÓMEZ mostrou, em 211 episódios, nos anos de 1992 a 1998, uma taxa de mortalidade de, aproximadamente, 28% relacionada à gravidade do quadro inicial e à presença de complicações (GOMEZ *et al.*, 2004). Outros autores encontraram que a mortalidade atribuída à infecção causada por *P. aeruginosa* foi de 5%, e os fatores independentes para morte foram a presença de bacteremia ou de doença de base, com expectativa de sobrevida menor do que dois meses (BOUZA *et al.*, 2003).

YANG e colaboradores, em estudos que tiveram como objetivo avaliar perfil clínico dos pacientes, susceptibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos e fatores de risco de multi-resistência às drogas (MDR), mostraram que, num total de 62 episódios avaliados, a taxa de mortalidade em pacientes com *P. aeruginosa* MDR foi de 57,1%, em comparação com 9,1% em pacientes portadores de *P. aeruginosa* não-MDR. (YANG *et al.*, 2011).

Uma análise realizada no laboratório de microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 2005, em que se determinou o perfil de susceptibilidade de 2.228 linhagens de *P. aeruginosa* isoladas de diversos materiais, mostrou resultados bastante preocupantes quanto à sensibilidade das amostras: aztreonam 55%, ciprofloxacina 55%, gentamicina 61%, imipenem 63%, amicacina 66%, ceftazidima 71% piperaciclina/tazobactam 71% e cefepime 77% (FRANCO, 2010).

A patogênese dos processos em que *P. aeruginosa* está envolvida deve ser discutida no contexto de infecção oportunista. A hospitalização aumenta fortemente a quantidade de portadores, particularmente na pele dos queimados, no trato respiratório dos pacientes que se submeteram à ventilação mecânica, no trato intestinal daqueles que receberam quimioterapia e

em qualquer sítio dos que foram tratados com antimicrobianos (PALLERONI *et al.*, 1998; POLLACK *et al.*, 2000; MARRA *et al.*, 2011).

A verdadeira frequência de infecções hospitalares causadas por *Acinetobacter* spp. não é de fácil determinação, em parte por que o isolamento destes microrganismos, a partir de espécimes clínicos, pode não necessariamente refletir a infecção, mas, sim, resultar de colonização (BERGOGNE-BEREZIN *et al.*, 1996; PELEG *et al.* 2008; MATSUNAGA, 2012).

Há três principais fatores que, possivelmente, contribuem para a persistência de *A. baumannii* em ambiente hospitalar: a resistência às principais drogas antimicrobianas, à dessecação e aos desinfetantes. A resistência aos antimicrobianos pode propiciar a determinadas linhagens de *A. baumannii* vantagem seletiva em um ambiente, como na unidade de terapia intensiva, onde microrganismos são desafiados com ampla exposição aos antimicrobianos (PELEG *et al.*, 2008).

A literatura traz, também, numerosos relatos de *Acinetobacter* spp. causando infecções na pele, feridas, abscessos, endocardites, peritonites e em feridas por queimaduras (BERGOGNE *et al.*, 1996; CISNEROS e BANÑO, 2002; PELEG *et al.*, 2008). Em infecções de ferida, *Acinetobacter* spp. raramente é o único microrganismo isolado. Geralmente, estas infecções são polimicrobianas, associadas a outras bactérias Gram negativas, anaeróbias facultativas ou anaeróbias obrigatórias (TOWNER, 1997; BARAN *et al.*, 2008; MATSUNAGA, 2012).

Acredita-se que, durante a guerra do Vietnã, *Acinetobacter* spp. tenha sido o bacilo Gram negativo mais encontrado em ferimentos traumáticos de extremidades. A observação desses ferimentos revelou que bactérias desse grupo estavam presentes precocemente nas feridas e causavam bacteremia em um período de três a cinco dias após a manifestação clínica dos ferimentos (ALLEN *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2009). Mais recentemente, durante a Guerra do Iraque de 2003 a 2005, também foram documentados numerosos casos de osteomielite e infecções de partes moles causadas por *Acinetobacter* spp. em soldados americanos e britânicos (JOLY-GUILLOU, 2005; TURTON *et al.*, 2006, DIJKSHOORN *et al.*, 2007).

Antes da década de 1970, as principais infecções envolvendo *Acinetobacter* spp. foram as pós-operatórias e do trato urinário. Hoje, essas bactérias são causadoras de pneumonia nosocomial, especialmente após o uso de procedimentos de ventilação mecânica (EDIS *et al.*, 2010). McDonald e colaboradores, em 1999, relataram um aumento de 0,64% para 6,4% na incidência de pneumonia nosocomial causada por *Acinetobacter*, entre 1976 e 1990. Surto de *A. baumannii* em infecções hospitalares têm sido um problema significativo em muitas partes da

Europa, principalmente na Inglaterra, França, Alemanha, Espanha e países baixos, e têm sido investigados usando métodos moleculares de tipagem epidemiológica (BERGOGNE-BEREZIN, 1996; NEMEC, 2004; PELEG *et al.*, 2008).

A bacteremia causada por *A. baumannii* é, caracteristicamente, uma infecção nosocomial oportunista, mais frequentemente adquirida em UTIs. Atinge predominantemente pacientes suscetíveis, que tenham sido submetidos previamente a procedimentos invasivos. Estes procedimentos incluem catéteres intravasculares, cateteres urinários, ventilação mecânica e cirurgia prévia. Alguns destes casos podem ser secundários à infecção causada pelo uso de cateter intravascular não diagnosticada, ou ter origem intestinal, em decorrência da translocação bacteriana (CISNEROS & BANÕ, 2002; MARRA *et al.*, 2011).

MARRA e colaboradores analisaram 2.563 casos de pacientes com INCS no período de 12 de junho de 2007 a 31 de Março de 2010, encontrando etiologia monomicrobiana em, aproximadamente, 95% dos mesmos. Dessas infecções, 58,5% foram causadas por bactérias Gram negativas, 35,4% por Gram positivas e 6,1% por fungos. Os patógenos mais comuns foram *Staphylococcus aureus* (14,0%), estafilococos coagulase-negativa (12,6%), *Klebsiella* spp. (12,0%) e *Acinetobacter* spp. (11,4%), ocorrendo na unidade de terapia intensiva em 49% dos casos. Das amostras de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas, 55,9% e 36,8%, respectivamente, eram resistentes ao imipenem (MARRA *et al.*, 2011).

Acinetobacter spp. e *P. aeruginosa* são emergentes como patógenos que frequentemente causam infecções em pacientes internados em unidades de terapia intensiva, conforme já mencionado (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004). Em ambos os gêneros bacterianos, a resistência das amostras a várias classes de antimicrobianos compromete seriamente a capacidade de se tratar os pacientes infectados. Em contraste com linhagens adquiridas na comunidade, as isoladas de ambientes hospitalares exibem elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos e são, muitas vezes, resistentes a múltiplas drogas (BERGOGNE-BEREZIN, 1996; ALLERBERGER *et al.*, 1999; PELEG *et al.*, 2008).

O papel das mãos dos profissionais de saúde na disseminação de microrganismos no ambiente hospitalar é um dos mais importantes e valorizados aspectos da epidemiologia das infecções hospitalares, norteador boa parte das atividades educacionais das Comissões de Controle de Infecções Hospitalares (KERR *et al.* 2002; WATERS *et al.* 2004; MARRA *et al.*, 2011).

2.4. Mecanismos de resistência a antimicrobianos em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

Resistência bacteriana pode ser definida como um conjunto de mecanismos de adaptação das bactérias contra os efeitos nocivos ou letais de desafios aos quais estas estão sendo submetidas (BECEIRO *et al.*, 2012). No caso da resistência intrínseca ou inata, o microrganismo possui naturalmente uma determinada estrutura que lhe confere resistência a um ou a vários antimicrobianos (LIVERMORE, 1995; NARTEN *et al.*, 2011). A resistência adquirida resulta da alteração da estrutura e/ou fisiologia celular, causada por mudanças genéticas no microrganismo. Esta pode ocorrer por mutação gênica e seleção, ou aquisição genes responsáveis pela expressão da resistência de outra bactéria (pelos mecanismos de transformação, conjugação e transdução), ou, ainda, uma associação de ambas (DZIDIC & BEDEKOVIC, 2003; TENOVER, 2006; NARTEN *et al.*, 2011). A emergência da resistência aos agentes antimicrobianos está relacionada à pressão seletiva exercida pelo uso intenso e indiscriminado desses medicamentos e a fatores relacionados às bactérias (PELEG *et al.*, 2008; NARTEN *et al.*, 2011).

Desde o surgimento dos carbapenêmicos como escolha terapêutica empírica no tratamento de infecções graves por *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., o uso desta classe tem sido ameaçado pelo aumento da incidência de β -lactamases que podem hidrolisar estes antimicrobianos, e pela disseminação de clones multirresistentes (GALES *et al.*, 2003; ZAVASCKI *et al.*, 2011; KIRIKAE, 2012). Alterações de proteínas de membrana externa (porinas), hiperexpressão de bombas de efluxo, alteração nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) e produção de β -lactamases, são mecanismos que podem estar relacionados à resistência aos β -lactâmicos em *P. aeruginosa* e em *Acinetobacter* spp. (ZAVASCKI *et al.*, 2011).

2.4.1 Alteração de proteínas de membrana externa

As *outer membrane proteins* (OMPs) dos microrganismos Gram negativos, são proteínas transmembranares, responsáveis pela difusão de pequenos metabólitos, como açúcares, aminoácidos e íons, e pela expulsão de produtos não utilizados pela célula bacteriana. A perda, ou a diminuição, da expressão dos genes que codificam as OMPs, afetam a função de porinas e podem causar a redução no acesso dos agentes antimicrobianos ao alvo na célula (QUALE *et al.*, 2003).

Muitos dos surtos de infecção com a participação de linhagens de *A. baumannii* resistentes ao imipenem são devidos à perda de porinas (QUALE *et al.*, 2003). Recentemente, foi identificada em *A. baumannii* uma proteína de 43-kDa como homóloga da porina OprD (porina

frequentemente associada à resistência ao imipenem em *P. aeruginosa*) (POIREL & NORDMANN, 2006).

A proteína de membrana mais importante em *P. aeruginosa* é a OprD ou porina D2, e a perda desta, assim como a sua expressão reduzida, causam resistência ao imipenem e podem levar à redução da sensibilidade ao meropenem, mas não confere resistência a outros β -lactâmicos, a não ser aos carbapenêmicos (JACCARD *et al.*, 1998; HORII *et al.*, 2003; ZANETTI *et al.*, 2003; MULLER *et al.*, 2011).

2.4.2 Bombas de efluxo

O papel natural do sistema ou bombas de efluxo é remover os produtos químicos que poderiam desestruturar a membrana citoplasmática. No entanto, do ponto de vista da resistência a drogas, elas tem poderosa habilidade de expulsar ativamente antimicrobianos, como β -lactâmicos, quilononas e, algumas vezes, até aminoglicosídeos. As bombas de efluxo apresentam, geralmente, três componentes: a própria bomba, uma proteína ligadora e uma proteína de membrana, que age como portal de saída (BOMONO & SZABO, 2006).

No entanto, há alguns anos, houve relatos de que a resistência aos aminoglicosídeos, β -lactâmicos, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e ao corante brometo de etídio era devida à superexpressão da bomba de efluxo AdeABC (MAGNET *et al.*, 2001; ROCA *et al.*, 2011). Esta é codificada cromossomicamente e pertence à família da bomba tipo RND (SAIER *et al.*, 1994). Essa bomba é constituída por uma proteína transmembranar ADEB, que contém 12 segmentos e apresenta um elevado grau de similaridade (cerca de 50%) com as diversas proteínas da RND (SAIER *et al.*, 1994; PAULSEN *et al.*, 1996; ROCA *et al.*, 2011). ADEA é homóloga à proteína de fusão membranar, enquanto ADEC é mais semelhante à proteína de membrana externa OprM de *P. aeruginosa* (KORETKE *et al.*, 2000; ROCA *et al.*, 2011).

O sistema de bomba de efluxo MexAB-OprM é comum em *P. aeruginosa* e compreende uma ou a própria bomba (MexB), uma lipoproteína ligadora (MexA) e uma proteína de membrana que age como portal de saída (OprD) (BOMONO & SZABO, 2006; MULLER *et al.*, 2011). Esse sistema, quando hiperexpresso, leva à resistência a quilononas, a penicilinas e a cefalosporinas. A sensibilidade ao meropenem pode ser diminuída quando este mecanismo de resistência está presente, mas, geralmente, não afeta a eficácia do imipenem e de aminoglicosídeos (LIVERMORE, 2002; MULLER *et al.*, 2011). Em contraste, a hiperexpressão do sistema MexXY-OprM é co-regulada pela proteína OprD, levando à resistência a múltiplas drogas, incluindo imipenem, meropenem, quinolonas, penicilinas, aztreonam e cefalosporinas (OCHS *et al.*, 1999; MULLER *et al.*, 2011).

2.4.3 Alteração das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs)

Desde a descoberta das PBPs como alvo dos agentes β -lactâmicos, o papel da resistência desse grupo de antimicrobianos tem sido objeto de estudo (ZAPUN *et al.*, 2008; CAYO *et al.*, 2011). Essas proteínas são transpeptidases ou carboxipeptidases localizadas na membrana citoplasmática, envolvidas na síntese do peptidoglicano, catalisando a transpeptidação entre duas subunidades da mureína (SCHEFFERS *et al.*, 2005; CAYO *et al.*, 2011). A inibição dessas proteínas produz um desequilíbrio na síntese da parede celular, resultando na inibição do crescimento ou lise osmótica celular (ZAPUN *et al.*, 2008).

A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos devida à alteração de PBPs é mais comum em microrganismos Gram positivos em relação aos Gram negativos. Entretanto, estudos têm mostrado que a resistência a carbanêpêmicos em *P. aeruginosa* está associada à alteração na PBP-4 (BELLIDO *et al.*, 1990). Em contraste, a resistência aos carbapenêmicos observada em *A. baumannii* é explicada pela redução da expressão de PBP-2, como descrito em amostras isoladas em Sevilha, Espanha (FERNANDEZ-CUENCA *et al.*, 2003; CAYO *et al.*, 2011).

2.4.4 Produção de β -lactamases

Agentes β -lactâmicos tais como penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, estão entre os antimicrobianos mais frequentemente prescritos em todo o mundo. Em patógenos Gram negativos, as β -lactamases são os principais fatores contribuintes para a resistência aos antibióticos β -lactâmicos, e sua alarmante evolução parece estar diretamente ligada ao uso clínico de novas sub-classes de β -lactâmicos (MEDEIROS, 1997; MURRAY *et al.*, 2006; BUSH-JACOBY, 2010).

A resistência de *P. aeruginosa* e espécies de *Acinetobacter* a β -lactâmicos está associada, principalmente, com a produção de β -lactamases, que são enzimas que catalisam a hidrólise dos antimicrobianos β -lactâmicos, rompendo o anel β -lactâmico e tornando o antimicrobiano inativo (LIVERMORE, 1995; BUSH-JACOBY, 2010; KIRIKAE, 2012). Os β -lactâmicos atuam na última etapa da síntese do peptidoglicano. Penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos podem ser hidrolisados por vários tipos de β -lactamases e a interação dessas enzimas e seus substratos resulta em compostos inativos, que permitem a sobrevivência da célula bacteriana (BUSH, 2001).

Os genes que codificam as β -lactamases podem ser cromossômicos ou plasmidiais, e a mobilidade genética pode ser ampliada por meio de transposons, que transportam os respectivos

genes dos plasmídeos para os cromossomos; apesar de mais incomum, o inverso também pode ocorrer (LIVERMORE, 1995; BUSH-JACOBY, 2010).

Diferentes tipos de β -lactamases foram descritas e classificadas, mas, atualmente, duas classificações prevalecem como de maior importância: a de Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH *et al.*, 1995; BUSH-JACOBY, 2010), que correlaciona o substrato preferencial e as propriedades inibitórias à estrutura molecular da enzima, criando quatro grupos (1, 2, 3 e 4) e a classificação de Ambler, proposta com base na estrutura molecular ou sequência nucleotídica e de aminoácidos dessas enzimas (β -lactamases). Nesta última, até o momento, quatro classes são reconhecidas A, B, C e D. As pertencentes às classes A, C e D agem por um mecanismo baseado em resíduo de serina cataliticamente ativo para inativação da droga, enquanto as da classe B ou metalo- β -lactamases (MBLs) requerem zinco para sua atividade catalítica, e operam através de um mecanismo completamente diferente (AMBLER, 1980; MAJIDUDDIN *et al.*, 2002; BUSH-JACOBY, 2010).

2.4.4.1 Classe A

- **Beta-lactamases de espectro ampliado ou estendido (ESBL)**

Enzimas pertencentes às classes A e D de Ambler contêm, em sua maior parte, uma serina no seu sítio ativo, e são introduzidas dentro do grupo funcional 2 do Bush-Jacoby-Medeiros. As ESBLs hidrolisam as cefalosporinas (exceto as cefamicinas) e os monobactâmicos, não hidrolisando os carbapenêmicos. A ação hidrolítica destas enzimas é bloqueada pelos inibidores de β -lactamases, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (AMBLER, 1980; BUSH *et al.*, 1995; BUSH-JACOBY, 2010).

As ESBLs mais comumente isoladas de amostras de *A. baumannii*, têm sido TEM-1 (VILA *et al.*, 1993; BOU *et al.*, 2000) e PER-1 (VAHABOGLU *et al.*, 1997; YONG *et al.*, 2003), na França, Bélgica, Bolívia, Turquia, Coreia e Estados Unidos. No entanto, estas enzimas não conferem resistência aos carbapenêmicos. Outras enzimas como VEB-1, (CARBONNE *et al.*, 2005; POIREL *et al.*, 2003); SHV-12, (BERGOGNE-BEREZIN, 1996; HUANG *et al.*, 2004); TEM-92, TEM-116 e CTX-M-2 (NAGANO *et al.*, 2004) já foram, também, relatadas em amostras de *A. baumannii* (PEREZ *et al.*, 2007). Em *P. aeruginosa*, as enzimas isoladas são CTX-M, (AL NAIEMI *et al.*, 2006), PER-1 (CLAEYS *et al.*, 2002; DECHAMPS *et al.*, 2002); VEB, GES e IBC também têm sido descritas (NAAS *et al.*, 1999). Essas enzimas são remotamente relacionadas do ponto de vista genérico; no entanto, compartilham o mesmo perfil bioquímico de hidrólise e inibição pelos diferentes compostos da classe dos β -lactâmicos (WELDHAGEN *et al.*, 2003; BUSH-JACOBY, 2010).

- **Carbapenemases**

Carbapenemases são β -lactamases do grupo funcional 2 ou da classe molecular A. Estas enzimas são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam e conferem resistência aos carbapenêmicos, cefalosporinas e penicilinas. Seus mecanismos hidrolíticos requerem um sítio ativo de serina (AMBLER, 1980; BUSH *et al.*, 1995). Esta classe compreende cinco grupos SME, IMI, NMC, KPC e GES/IBC, e todos têm em comum, três domínios altamente conservados, essenciais para sua atividade: Ser₇₀-X-XLys; Ser₁₃₀-Asp-Asn e Glu₁₆₆. Em *P. aeruginosa*, tem sido detectada as variantes KPC-2 em linhagens clínicas isoladas na Colômbia, KPC-5 em Porto Rico e GES-2 de amostras de *P. aeruginosa* isoladas na África do Sul (QUEENAN & BUSH, 2007; VILLEGAS *et al.*, 2007; WOLTER *et al.*, 2009). Ao contrário da GES, todas as enzimas KPC mostram atividade de carbapenemase; embora os relatos destas enzimas continuem a crescer, não há dados recentes das carbapenemases NMC/IMI e SME em amostras de *P. aeruginosa* (WALSH, 2010) (FIG 1).

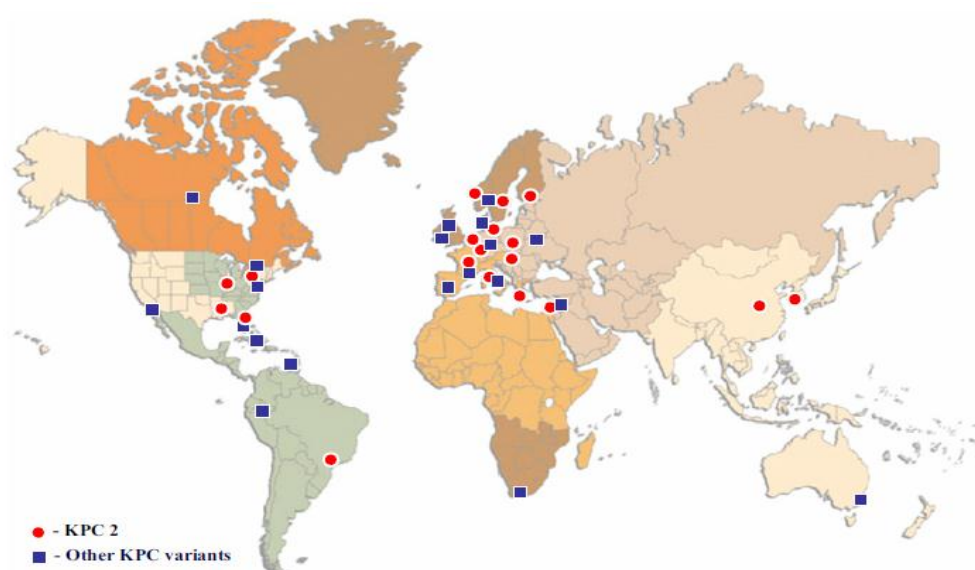


FIGURA 1 - Distribuição global da β -lactamases KPC.

Fonte: Walsh, 2010, p. S8 – S14

2.4.4.2 Classe D

- **Oxa- β -lactamases ou OXA carbapenemases**

As enzimas do tipo OXA pertencem a outra crescente família das ESBLs. Essas β -lactamases diferem das enzimas TEM e SHV por pertencerem à classe molecular D e grupo

funcional 2d. Seus mecanismos hidrolíticos requerem um sítio ativo de serina (AMBLER, 1980; BUSH *et al.*, 1995). Estas hidrolizam as oxacilinas, oximino-cefalosporinas e cabanêpemicos, e são pouco inibidas pelo ácido clavulânico. A eficiência hidrolítica das oxacilinas contra carbapenênicos é muito menor que a das MβLs (AMBLER, 1980; BUSH *et al.*, 1995; POIREL & NORDMANN, 2006; BUSH-JACOBY, 2010). Embora tenham sido descritas em outros bacilos Gram negativos, estas ocorrem predominantemente em *P.aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. e em genes cromossômicas, mas vêm sendo descritas também em algumas espécies de bactérias Gram negativas como *Aeromonas*, *Legionella*, *Shewanella* e *Campylobacter* (POIREL *et al.*, 2010; POIREL *et al.*, 2001; BUSH-JACOBY, 2010).

O perfil de hidrólise das Oxa-β-lactamases é muito similar. Estas enzimas hidrolisam imipenem e meropenem rapidamente, mas com menos eficiência que as metalo-β-lactamases, e não hidrolisam cefalosporinas de espectro estendido e aztreonam. Sua atividade é inibida por ácido clavulânico, uma propriedade comum das oxacilinas, exceto pela OXA-23, que é resistente ao ácido clavulânico. Já as enzimas OXA-24 e OXA-27 hidrolisam benzilpenicilinas e cefaloridina (NORDMANN & POIREL, 2002; BEN *et al.*, 2011).

A primeira Oxa-β-lactamase foi descoberta em uma amostra de *A. baumannii*, isolada em 1985, na Escócia, sendo inicialmente denominada ARI-1 (*Acinetobacter* Resistente ao Imipenem). Esta foi renomeada como OXA-23 e é a representante do grupo formado também por OXA-27 e OXA-49, com 99% de homologia entre os aminoácidos (POIREL & NORDMANN, 2006; BEN *et al.*, 2011). Embora parâmetros cinéticos de hidrólise tenham sido determinados com extratos brutos de OXA-23, dados recentes indicam que, semelhante ao que tem acontecido com outras, linhagens de *A. baumannii* OXA-23-positivo têm se espalhado pelo mundo, para locais incluindo França, Bulgária, Irã, *United Arab Emirates*, Tunísia, Brasil e Austrália e outros países, como mostra a FIG. 2 (POIREL *et al.*, 2010, WALSH, 2010).

As ESBL tipo OXA de *Acinetobacter* spp. são divididas em quatro subgrupos filogenéticos: OXA-23; OXA-24; OXA-51 e OXA-58. Recentemente, foi sugerido que as enzimas pertencentes ao subgrupo do tipo OXA-51 seriam intrínsecas em *A. baumannii*, ocorrendo na maioria ou em todas as linhagens (WOODFORD *et al.*, 2006). As oxacilinas OXA-5, OXA-7, OXA-10 e OXA-13, OXA-2, OXA-3, OXA-15, também têm sido descritas em *P.aeruginosa* (BUSH-JACOBY, 2010; BEN *et al.*, 2011).

No Brasil, *A.baumannii* produzindo OXA-23 foi detectado pela primeira vez em 2003, em Curitiba, cidade da Região Sul, e rapidamente se espalhou para Estados vizinhos. Desde então,

tem-se notado uma incidência crescente de infecções causadas por amostras dessa bactéria resistentes a carbapenêmicos (FURTADO *et al.*, 2011).

Estudo realizado em São Paulo avaliando infecção da corrente sanguínea por *A. baumannii* em um Hospital Universitário mostrou que, das 29 linhagens resistentes a carbapenêmicos detectadas em pacientes de uma UTI, 21 (72,4%) delas foram positivas para a enzima OXA-23 (FURTADO *et al* 2011).

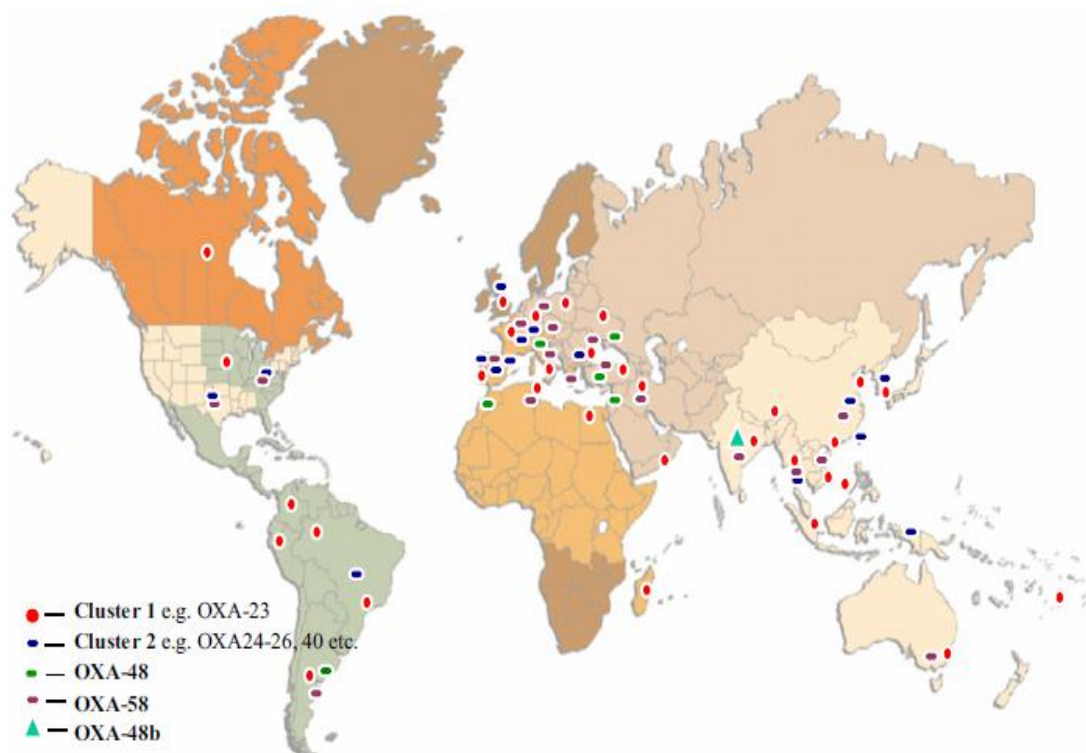


FIGURA 2 - Distribuição global dos principais grupos de oxa carbapenemases.

Fonte: Walsk, 2010, p. S8 – S14

2.4.4.3 Classe C

- **Cefalosporinase**

As β -lactamases do tipo cefalosporinases cromossomais ou AmpC, pertencentes ao grupo funcional 1 ou à classe molecular C, não são inibidas pelo ácido clavulânico e têm modo de expressão cromossômico-induzível, sendo encontradas constitutivamente em *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e nas enterobactérias (AMBLER, 1980; BUSH *et al.*, 1995; BUSH-JACOBY, 2010).

Na ausência de β -lactâmicos, a AmpC é normalmente produzida em baixos níveis, mas a presença de alguns antimicrobianos, como os carbapenêmicos pode induzir a produção desta enzima, sendo essas drogas consideradas fortes indutores destas β -lactamases, mas são estáveis à atividade hidrolítica desta enzima. O clavulanato pode induzir a expressão da AmpC, resultando em antagonismo da atividade bactericida da ticarcilina. Alguns autores sugerem que a associação ticarcilina/clavulanato deve ser evitada como alternativa de β -lactâmico anti-pseudomonas (LISTER *et al.*, 1999). Quando esses antimicrobianos indutores são retirados do meio, a produção pode voltar aos níveis basais que, normalmente, são baixos (JUAN *et al.*, 2005; BUSH-JACOBY, 2010).

Um número crescente de β -lactamases que confere resistência às cefalosporinas de espectro ampliado tem sido identificado em *Acinetobacter* spp., como aquelas que conferem resistência às oximinocefalosporinas (ceftazidima e cefotaxima), geralmente relacionadas com a superprodução do residente do tipo AmpC β -lactamase, codificada pelo gene *bla*_{AmpC}. A superexpressão desse gene tem sido associada com a sequência de inserção ISAb₁, proporcionando um promotor forte. Mais recentemente, as variantes AmpC têm sido nomeadas de acordo com uma nomenclatura específica para *A.baumannii* (ADC, *Acinetobacter - Derived Cephalosporinases*) (BOU *et al.*, 2000; HUJER *et al.*, 2005; 2006; DRAWZ *et al.*, 2010).

2.4.4.4 Classe B

- **Metalo- β -Lactamases (MBLs)**

A produção de enzimas metalo- β -lactamases por alguns patógenos é motivo de preocupação mundial, sendo notável pelo seu amplo espectro de atividade contra a maioria dos agentes β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, e também pela resistência que essas enzimas apresentam aos inibidores de β -lactamases (OLIVEIRA, 2007; CORNAGLIA *et al.*, 2011). Essas enzimas, cujos genes são localizados em plasmídeos e integrons, são caracterizadas por um centro binuclear de zinco, ou outros cátions divalentes como co-fator para a atividade catalítica e, por isso, sofrem a inibição por quelantes iônicos, como etilenodiaminotetracético EDTA e derivados do tiol, como o ácido 2-mercapto-propiónico (2-MPA) (AMBLER, 1980; BUSH *et al.*, 1995; ARAKAWA *et al.*, 2000; SIEMANN *et al.*, 2002; WALSH 2010; CORNAGLIA *et al.*, 2011).

As metalo- β -lactamases pertencem à classe B de Ambler ou à classe 3 de Bush-Jacoby-Medeiros e hidrolisam todos os β -lactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção

os monobactâmicos, como o aztreonam (AMBLER, 1980; BUSH *et al.*, 1995; WALSH 2010; CORNAGLIA *et al.*, 2011).

As MBLs podem ser produzidas intrinsecamente por alguns microrganismos, ou podem ser adquiridas. A produção constitutiva dessas enzimas é carregada nos cromossomos; geralmente, são bactérias cujo habitat é, predominantemente, o meio ambiente, e estas são raramente patogênicas, como *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp. e *Chryseobacterium meningosepticum*, (NORDMANN & POIREL, 2002).

Entretanto, desde o início da década de 1990, novos genes que codificam MBLs têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae* (NORDMANN & POIREL, 2006). Estas novas enzimas foram denominadas de MBL móveis ou adquiridas, devido ao fato de os genes serem inseridos em estruturas genéticas que fornecem mobilidade. Assim, as MBL adquiridas são codificadas por cassetes gênicos localizados no cromossomo ou plasmídeos bacterianos. No entanto, com exceção da enzima SPM-1, que é codificada por um gene localizado em plasmídeo, as demais são codificadas por genes localizados em integrons de classe 1 (MENDES *et al.*, 2006). Na maioria das amostras clínicas, os seus integrons são da classe 1, embora já tenham sido descritas outras classes distintas de integrons classe 2, 3, e 4 (SABATÉ & PRATS, 2002).

Hall e Collis definem integron como um elemento dinâmico que contém os determinantes genéticos dos componentes de um sistema de recombinação sítio-específico, que reconhece e captura cassetes gene móvel. A estrutura inclui uma região conservada 5' (5'-CS), formada por um gene *int1*, uma região promotora e um sítio de recombinação (*att1*) e uma região conservada 3' (3'-CS). A última região é, geralmente, composta pelo gene *qacEΔ1*, que codifica a resistência a compostos de amônio quaternário; pelo gene *sul1*, que codifica a resistência a sulfonamidas; pelo gene *orf5*, de função desconhecida, e pelo módulo *tniA* (HALL & COLLIS, 1995).

O integrons não são estruturas genéticas que se movem por si sós. Normalmente, são localizados em transposons, que podem mobilizar os integrons entre diferentes estruturas genéticas. Estes são, geralmente, constituídos de elementos genéticos que codificam as transposases (*tnpA*), responsáveis pelo movimento do transposon, e resolvases (*tnpR*), responsáveis pela recombinação ao sítio específico, e um sítio de recombinação (*res*) (LIEBERT *et al.*, 1999). A grande mobilidade destes genes sugere que a resistência aos carbapenêmicos e

cefalosporinas continuará a aumentar e poderá conferir um enorme potencial de disseminação destes genes em outros patógenos nosocomiais (LINCOPAN *et al.*, 2005; WALSH 2010; CORNAGLIA *et al.*, 2011).

Atualmente, são conhecidas nove subclasses de MBL adquiridas (WALSH 2010; CORNAGLIA *et al.*, 2011). A imipenemase (IMP) foi a primeira a ser descoberta em uma amostra de *Serratia marcescens* encontrada no Japão, local onde os carbapenêmicos são amplamente utilizados (OSANO *et al.*, 1994). Em 1997, a segunda MBL Verona imipenemase (VIM), foi encontrada na Itália, em uma amostra clínica de *P. aeruginosa* (LAURETTI *et al.*, 1999). Desde então, já foram descritas, aproximadamente, 26 variantes de IMP e 26 diferentes tipos de VIM, sendo a maior parte na Europa, embora algumas variantes tenham sido encontradas na América do Norte, na América Latina e na Ásia (WALSH *et al.*, 2003; CORNAGLIA *et al.*, 2011).

A família São Paulo metalo- β -lactamase (SPM) foi descrita em 1997, em amostras clínicas de *P. aeruginosa*, no Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo (HSP/UNIFESP) (TOLEMAN, *et al.*, 2002; GALES *et al.*, 2003). A quarta família descrita foi a German imipenemase (GIM-1), descoberta em amostras clínicas de *P. aeruginosa* isoladas na Alemanha (CASTANHEIRA, *et al.* 2004). A Seoul imipenemase (SIM-1) é a quinta família de MBL, detectada em sete amostras clínicas de *A. baumannii* provenientes da Coreia, entre 2003 e 2004 (LEE, *et al.*, 2005); a sexta é a Australian imipenemase (AIM), descoberta em uma amostra *P. aeruginosa* isolada em 2007, na Austrália (GUPTA, 2008). Nova Deli metalo- β -lactamase (NDM) é sétima família, isolada em *Klebsiella pneumoniae* de amostra de urina na Índia (YONG *et al.*, 2009). A oitava família, Kyorin hospital metalo- β -lactamase (KHM) (SEKIGUCHI, *et al.*, 2008), foi isolada a partir de uma amostra clínica de *Citrobacter freundii* no Japão. A Duth imipenemase (DIM), a nona da família das MBL, foi detectada em amostras clínicas de *Pseudomonas stutzeri* na Holanda (PORIEL *et al.*, 2010).

Desde seus relatos iniciais, não há indicação de que as MBL pertencentes às famílias GIM e AIM tenham se disseminado além de seus países de origem. No entanto, as famílias IMP, NDM, SPM e VIM continuam sendo detectadas ao redor do mundo, (como mostrado na FIG. 3) inclusive em membros do grupo das enterobactérias (QUEENAN & BUSH, 2007; WALSH 2010; CORNAGLIA *et al.*, 2011).

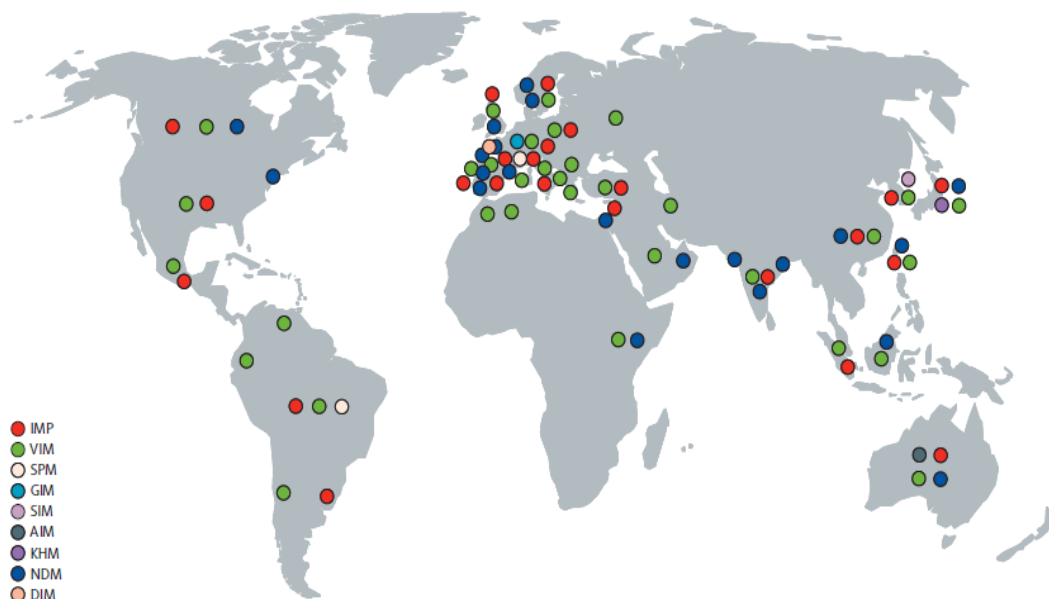


FIGURA 3 - Disseminação global dos diferentes tipos de Metallo – β – lactamases.

Fonte: CORNAGLIA *et al.*, 2011: p. 381-93.

Legenda: IMP (imipenemase) VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metallo- β -lactamase), GIM (German imipenemase), SIM-1 (Soul imipenemase), AIM (Australian imipenemase), NDM (Nova deli metallo- β -lactamase), KHM (Kyorin hospital metallo- β -lactamase) e DIM (Duth imipenemase).

Os tipos de MBL detectados no mundo, incluindo o Brasil são SPM, IMP e VIM (WALSH 2010; CORNAGLIA *et al.*, 2011). As do tipo SPM são as mais frequentemente encontradas no país de origem, e tem sido detectadas em São Paulo (SP), Salvador (BA), Curitiba, Londrina e Maringá (PR), Brasília (DF), Santo André (SP) e Fortaleza (CE)(GALES *et al.*, 2003). As IMP foram detectadas nas cidades de Brasília (MENDES *et al.*, 2004), São Paulo (SADER *et al.*, 2005), Rio de Janeiro (CARVALHO *et al.*, 2006) e Porto Alegre (ZAVASCKI *et al.*, 2007) e as VIM, em São Paulo (SADER *et al.*, 2005). Entre as amostras de *A. baumannii*, foram detectadas apenas as do tipo IMP, na cidade de São Paulo (GALES *et al.*, 2003).

Em trabalho realizado na Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, investigou-se a presença de MBL adquirida em amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas de pacientes internados no Hospital São Paulo, no período entre maio de 1993 e novembro de 2001. Entre as amostras que apresentaram resistência ou sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos 54,8% (40/73) eram produtoras de IMP-1, sendo que a emergência desse determinante de resistência foi detectada em amostras bacterianas isoladas a partir de 1998. Além disso, após este ano, a produção de MBL adquirida pareceu ser o mecanismo responsável pelo fenótipo de resistência aos carbapenêmicos nas amostras avaliadas (TOGNIM, 2006).

A prevalência de MBL entre cepas de *P. aeruginosa* isoladas em hemocultura de pacientes do complexo do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no ano de 2005 foi de 30,4% sendo detectadas enzimas do tipo SPM-1 e VIM-2 (FRANCO, 2010).

Em Uberlândia, Minas Gerais, estudos sobre pneumonia associada à ventilação por *P. aeruginosa* em UTI, avaliando aspectos epidemiológicos e moleculares de amostras produtoras de MBL, mostraram que a maioria das amostras (95%) era resistente a antimicrobianos, imipenem e outros, com exceção de polimixina, e mostrou a produção M β L (76,7%). Apenas *bla*_{SPM-1} foi identificada em dos 15 (33%) espécimes analisados (CEZÁRIO *et al.*, 2010).

2.5 Detecção laboratorial, fenotípica e genotípica, de β -Lactamases e tipagem de patógenos nosocomiais

Com o aumento do número de relatos de linhagens produtoras de β -lactamases em diferentes regiões geográficas e a expansão da disseminação desses genes de resistência numa ampla variedade de microrganismos, a detecção dessas enzimas se torna importante, para que medidas de controle de infecção hospitalar possam ser implementadas, para prevenir a disseminação desse tipo de resistência e para a orientação terapêutica (BERTONCHELI & HÖRNER, 2008). Técnicas de fenotipagem e genotipagem são necessárias para a sua detecção. As primeiras consistem na avaliação das características expressas pelos microrganismos, ou seja, que resultam da expressão de genes e que podem sofrer variações, decorrentes de mudanças nas condições de crescimento, fase de crescimento e mutação espontânea. As demais envolvem a detecção de genes carregados pelos microrganismos.

Até o momento, não há métodos de detecção fenotípica de MBL padronizados pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Contudo, devido ao grande número de amostras produtoras de M β Ls em diferentes regiões do mundo, houve a necessidade de se desenvolver testes simples, práticos e de baixo custo que propiciassem o rastreamento de amostras produtoras de M β L pelo laboratório de rotina em microbiologia (MENDES *et al.*, 2006).

Como *screening* da atividade de carbapenemases, o Teste de Hodge Modificado (THM) pode, também, ser aplicado na rotina de laboratórios de microbiologia (LEE *et al.*, 2011). É um método simples para o rastreamento de bactérias produtoras de MBL, mas, isolados ocasionais mostram resultados falso-negativos. Inicialmente esse teste foi recomendado pelo CLSI para confirmação da suspeita de bactérias produtoras de enzimas carbapenemase em espécie de *Enterobacteriaceae* (CARVALHAES *et al.*, 2010).

O teste de disco-aproximação é o teste fenotípico mais utilizado, por apresentar boa sensibilidade, especificidade, baixo custo e ser de fácil execução, no entanto, as MBL variam em seu nível de inibição com certos inibidores e, também, variam em sua habilidade de conferir resistência para alguns substratos como ceftazidima e imipenem (WALSH *et al.*, 2005).

Segundo Lee e colaboradores 2005 as fitas de Etest MBL possuem alta sensibilidade e especificidade para a detecção de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. produtores de MBL. No entanto, o resultado obtido pode ser influenciado pelo nível de resistência ao imipenem e por outras condições do teste, como o armazenamento da amostra antes da realização do teste, pois as linhagens armazenadas por muito tempo à temperatura ambiente podem perder o gene que codifica MBL e apresentar um resultado falso negativo (LEE *et al.*, 2005).

Em estudo realizado na África do Sul, 49 amostras de *A. baumannii* foram avaliados para a presença de MBL com a fita de Etest MBL, a qual indicou a presença desta β -lactamase. A análise molecular dessas amostras detectou a presença de oxacilinase demonstrando que as fitas de Etest devem ser interpretadas com cautela em isolados de *A. baumannii*, sendo necessária a análise molecular para a correta identificação (SEGAL, *et al.*, 2005).

Para a identificação inicial de bactéria produtoras de ESBL deve-se utilizar a metodologia proposta pelo CLSI documento M100-S14 de janeiro de 2004, que utiliza antimicrobianos “marcadores” da possível presença de ESBL. Os antimicrobianos preconizados pelo CLSI como marcadores para triagem de ESBL e os pontos de corte para o método de difusão do disco (DALMARCO *et al.*, 2006).

A Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*-PCR) é uma técnica de referência para detecção dos diferentes genes que codificam as β -lactamases (WALSH *et al.*, 2005; 2010). Esta reação consiste em multiplicar uma quantidade mínima de fragmentos de DNA a ser estudado, e a reação ocorre em termociclador que, através de sucessivas mudanças de temperatura, direciona as três etapas da reação: desnaturação, anelamento e extensão.

Como já mencionado, as infecções bacterianas hospitalares são importante causa de morbidade e letalidade, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, e a transmissão de bactérias associadas a surtos hospitalares pode ser efetivamente controlada através de medidas adequadas. Para que isso seja possível, entretanto, é essencial discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie. Uma das primeiras etapas na investigação de um possível surto hospitalar é detectar a linhagem que está originando os casos de infecção. Para

tanto, deve-se proceder à tipificação epidemiológica da mesma. As investigações epidemiológicas têm-se tornado mais efetivas em decorrência do aprimoramento de diferentes métodos de tipagem de microrganismos. Esses métodos podem se basear em características fenotípicas, como os métodos tradicionais, ou utilizar métodos moleculares, mais avançados, os quais permitem analisar as características genotípicas de microrganismos (TENOVER *et al.*, 1995; NEELEMAN *et al.*, 2004; WALSH *et al.*, 2010).

A utilização da biologia molecular para a identificação de subtipos de microrganismos vem gerando importantes informações de interesse epidemiológico e clínico, como, a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE-*Pulsed Field Gel Eletrophoresis*) e reação em cadeia da polimerase com iniciador arbitrário (Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD). Esses recursos são reconhecidos e tidos como técnicas recomendadas para a tipagem de patógenos nosocomiais. O PFGE consiste na migração de fragmentos de DNA através do uso de diversos campos elétricos gerados em posições diferentes e alternadas, apresentando importância para o estudo da epidemiologia hospitalar de muitos microrganismos devido à sua alta capacidade discriminatória, boa reprodutibilidade e fácil interpretação (LOUREIRO *et al.*, 2002; WALSH *et al.*, 2010). O RAPD é um tipo de reação de PCR, mas os segmentos de DNA que são amplificados são aleatórios. Por meio destas técnicas, pode-se determinar a variabilidade genética, distâncias filogenéticas, demonstrar a inter-relação das amostras bacterianas e elucidar as vias de transmissão (SADER *et al.*, 1993; WALSH *et al.*, 2010).

A descoberta de que genomas procariotos contêm sequências repetitivas como a ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), tem expandido o uso da biologia molecular, útil para avaliar a variabilidade genética de vários isolados bacterianos, inclusive *E. coli* (VERSALOVIC *et al.*, 1991). ERIC-PCR são sequências de palíndromo imperfeitos de 127 pb que ocorrem em múltiplas cópias no genoma das bactérias entericas e vibrios (WILSON *et al.*, 2006). A ERIC-PCR possui uma boa capacidade discriminatória e pode substituir o RAPD-PCR ou RFLP, os quais são requeridos para demonstrar pequenos níveis de variabilidade genética (MAURER *et al.*, 1998).

LIPMAN e colaboradores 1995 citam que a genotipagem pelo método de ERIC-PCR é mais prático simples e rápido. Esta técnica é baseada na análise de sequências cromossômicas repetidas, que tem sido usada para a caracterização clonal de diferentes espécies de enterobactérias e para o estudo da relação genética entre isolados (COSTA *et al.*, 2006). Visando uma maior precisão da tipagem de microrganismos, técnicas moleculares foram desenvolvidas, apresentando elevada importância entre as linhagens envolvidas em casos de

infecção hospitalar, pois se aproximaram da possibilidade de erradicação de fontes ambientais, prevenção de infecções cruzadas e monitoramento da eficácia da terapia antimicrobiana (SILBERT, 2004).

2.6 Controle de infecções hospitalares no Brasil

No Brasil, o controle de infecções hospitalares (IH) foi implementado a partir da Portaria 196/83 do Ministério da Saúde. A Portaria 196 tornou obrigatória a implantação, em todos os hospitais, de comissões de controle de IH. Em 1987, foi criada a Comissão Nacional de Controle de IH, com representantes de vários Estados. Em 1988, a Portaria 232 criou o Programa Nacional de Controle de IH, transformado, em 1990, em Divisão Nacional de Controle de IH (BRASIL, 1983; 1988; 1997).

O Ministério da Saúde, ainda na década de 90, reconheceu que apenas 10% dos hospitais criaram comissões para controle de IH, o que o levou a reestruturar suas funções e descentralizar suas ações (BRASIL, 1992). Em 1992, foi publicada a Portaria 930 pelo Ministério da Saúde, que criou o Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH), definido como o conjunto de ações sistemáticas que visam à redução máxima possível da incidência e gravidade das IHS (COUTO, 2000).

Em 1997, o PNCIH foi delineado pela Lei 9.431, que obrigou os hospitais a criar uma comissão permanente de controle das infecções hospitalares, pela Portaria 2616/98 do Ministério da Saúde. De acordo com a lei, as comissões permanentes devem ser compostas por representantes dos médicos, enfermeiros e da administração hospitalar. Nos hospitais de médio e grande porte, também devem ser incluídos os representantes dos laboratórios de Microbiologia e das Farmácias hospitalares.

Em 2000, um ano após a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), apenas 12 Estados brasileiros possuíam comissões estaduais de controle de infecção. No fim de 2002, os 26 Estados e o Distrito Federal já haviam reorganizado suas comissões (FERNANDES *et al.*, 2000).

Estudos internacionais revelam que a existência de programa de controle de infecção hospitalar dentro dos serviços de saúde reduz em 30% a incidência desses agravos. Segundo a pesquisa da Assistência Médico-Sanitária divulgada pelo IBGE em 2006, no Brasil, 4.578 estabelecimentos de saúde, com serviço de internação, possuem Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, sendo 1.427 públicos e 3.151 privados (IBGE, 2006).

Vários programas vêm sendo implantados nos últimos anos, na tentativa de conter a disseminação da resistência antimicrobiana. Em 2004, a ANVISA, em parceria com a Organização Pan - Americana da Saúde - OPAS e com a Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública – CGLAB/MS, propôs a “Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM”. O projeto de implantação foi efetivado em janeiro de 2005, como o objetivo geral de controlar e reduzir o surgimento e a disseminação da resistência microbiana em serviços de saúde no País (http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/index.htm). Destaca-se o monitoramento do perfil de patógenos prioritários, pela realização de estudos epidemiológicos, identificação microbiana e estímulo de adoção de estratégias de prevenção e controle específicos para os patógenos estudados.

Quanto às funções dos laboratórios de Microbiologia, incluem-se, dentre outras, a identificação dos patógenos hospitalares e a avaliação da resistência destes às drogas antimicrobianas, a análise dos dados do perfil de suscetibilidade destes microrganismos e a implantação de normatização/padronização dos testes, de acordo com o CLSI. Dentre os microrganismos incluídos neste programa de vigilância destacam-se *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativos* com perfil de resistência às principais drogas utilizadas para o tratamento de infecções causadas por eles, e bactérias isoladas de infecção primária da corrente sanguínea.

Apesar de muitos esforços, o Brasil ainda enfrenta uma realidade diferente daquilo que se pode julgar satisfatória: carência de recursos humanos e materiais nas Instituições de saúde, ausência de Comitê de Controle de Infecção Hospitalar (CCIHs) atuantes em grande parte dos hospitais ou, ainda, profissionais exercendo a função sem conhecimento adequado da atividade, o que resulta em elevadas taxas de infecção hospitalar, ocorrência de surtos não detectados em berçários e unidades de terapia intensiva, emergência de bactérias resistentes a diversos antimicrobianos e elevado risco ocupacional (BATISTA, 2004).

Existe uma forte relação entre taxas de infecção e resistência a drogas nos hospitais. Em algumas pessoas, a condição de portador assintomático de bactérias resistentes a antimicrobianos é muito persistente. Entretanto, embora todos os países sejam afetados pela disseminação de microrganismos resistentes, não se conhece a extensão do problema nos países em desenvolvimento (ANG *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objectivo geral

Avaliar a resistência a antimicrobianos e a produção de enzimas metalo- β -Lactamases, oxacilinases e cefalosporinases, bem como a diversidade genética das amostras de *Acinetobacter baumannii* e *P. aeruginosa* recuperadas de hemoculturas em diferentes Hospitais de Belo Horizonte, Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de Disco-difusão, e determinar a concentração inibitória mínima a drogas antimicrobianas nos dois grupos bacterianos em estudo;
- Pesquisar por métodos fenotípicos, a produção de metalo- β -lactamases, oxacilinases, e cefalosporinases nas amostras incluídas no estudo;
- Investigar a presença de genes codificadores de MBL dos tipos *bla*_{IMP-1} (imipenemase), *bla*_{VIM-1} (Verona imipenemase), *bla*_{SPM-1} (São Paulo metalo- β -lactamase), *bla*_{GIM-1} (German imipenemase) e *bla*_{SIM-1} (Seoul imipenemase) nas amostras estudadas;
- Analisar a presença de genes codificadores de oxacilinases (*bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA51} e *bla*_{OXA58}) nas amostras em estudo;
- Pesquisar a presença de gene (*ampC*) codificador da cefalosporinase AmpC nas amostras avaliadas;
- Estudar a diversidade genética entre as amostras de *P.aeruginosa* e *A. baumannii* avaliadas e correlacioná-las com seus padrões genéticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras bacterianas

Foram avaliadas neste estudo 40 amostras de 64 amostras de *Acinetobacter baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes a drogas, isoladas de hemoculturas no período de dezembro de 2008 a junho de 2009.

O critério para definição de multirresistência adotado neste estudo foi o de resistência a pelo menos três antimicrobianos de diferentes classes, como sugerido pelo Projeto da Rede de Vigilância da Resistência Microbiana/ANVISA, a saber: piperacilina e/ou piperacilina/tazobactam; ceftazidima, cefepime; carbapenêmicos (imipenem e meropenem); fluoroquinolonas (ciprofloxacina e/ou levofloxacina); aminoglicosídeos (gentamicina e amikacina), ou sensibilidade apenas a carbapenêmicos (FALAGAS *et al.*, 2006).

As amostras bacterianas foram isoladas, identificadas e testadas quanto à sua susceptibilidade a antimicrobianos nos Laboratórios de Microbiologia dos cinco Hospitais Gerais de Belo Horizonte, utilizando-se Protocolos Operacionais Padrão de cada Instituição participante. Até o início desta pesquisa, as amostras foram estocadas em *freezer* a - 80°C, no meio líquido *Brain Heart Infusion* BHI-DIFCO (OXOID®, Basingstoke, ENGLAND) acrescido de 15% de glicerol. Todas as amostras tiveram sua identificação confirmada no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, ICB/UFMG, pelo sistema automatizado VITEK® 2 Compact (BIOMERIEUX, Marcy l'Etoile, FRANCE), utilizando-se o cartão para identificação de Gram negativo (GN TEST KIT VITEK II).

4.2 Instituições Participantes

Os hospitais dos quais as amostras foram obtidas apresentam características de atendimento geral de urgência e ambulatorial, a saber:

- Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais: é um hospital universitário, público e geral que realiza atividades de ensino, pesquisa e assistência, sendo referência no sistema municipal e estadual de Saúde no atendimento aos pacientes portadores de doenças de média e alta complexidade.
- Hospital de Pronto Socorro João XXIII: atua como centro de referência e excelência no atendimento a pacientes vítimas de politraumatismos, grandes queimaduras, intoxicações e situações clínicas e/ou cirúrgicas de risco de morte. É mantido pela Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais - FHEMIG

- Hospital Municipal Odilon Behrens: é um hospital público, geral, de ensino e de pesquisa que presta atendimentos de urgência/emergência clínica e traumatológica.
- Hospital Semper AS: é um hospital privado de atendimento geral em várias áreas da clínica médica, medicina intensiva, maternidade, pediatria, ginecologia e cirurgia geral.
- Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte: é uma organização filantrópica, sem fins lucrativos, que tem várias especialidades médicas no nível ambulatorial ou interação, pequenas e grandes cirurgias, pediatria e medicina intensiva.

4.3 Aspectos éticos da pesquisa

O projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos Hospitais participantes e do COEP/UFMG (ETIC 614/08). Os pacientes não foram identificados, nem foram utilizados dados clínicos referentes aos mesmos. A única informação registrada foi relativa ao setor de internação dos pacientes dos quais as amostras foram obtidas.

4.4 Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Para fins de padronização e considerando as peculiaridades das Instituições envolvidas no estudo, todas as amostras foram novamente submetidas a testes de susceptibilidade a antimicrobianos pelos métodos de Disco-Difusão e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por diluição em ágar, no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios.

4.4.1 Método de Disco-Difusão

Foi realizado de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Bauer-Kirby, 1966; CLSI, 2011). Os antimicrobianos avaliados foram os seguintes: Ceftazidima (CAZ) 30µg, Cefepime (CPM) 30µg, Amicacina (AMI) 30µg, Gentamicina (GEN) 10µg, Ciprofloxacina (CIP) 5µg, Levofloxacina (LVX) 5µg, Aztreonam (ATM) 30µg, Imipenem (IMI) 10µg, Meropenem (MER) 10µg e Polimixina B(POL) 300µg. Todos os discos foram obtidos da Laborclin (São paulo, BRASIL).

O inóculo bacteriano foi preparado pelo método de suspensão direta de colônias. Para o mesmo fim, colônias isoladas de culturas puras repicadas em Ágar Triptona de Soja TSA (Himedia®, MUMBAI-INDIA), incubados por 18 - 24h, foram suspensas em em mL salina 0,85% estéril a uma concentração correspondente ao valor de 0,5 da escala de *MacFarland*. A seguir, essa suspensão foi inoculada em três direções em uma placa de *Petri* de 15 cm de diâmetro contendo o meio ágar Muller-Hinton (BECTON DICKINSON®, Le Pont de Blaix, FRANCE), com o auxílio

de um swab estéril. Os discos foram dispensados na superfície do meio de cultura, respeitando-se uma distância de 20 mm um do outro e 15 mm da parede da placa. Após incubação das placas a 35 °C em estufa bacteriológica, por 24 horas, foi realizada a medida do diâmetro dos halos de inibição, com auxílio de um paquímetro. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os pontos de corte estabelecidos no documento M100-S21, (CLSI, 2011;Tabela 1). A amostra de referência *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle de qualidade dos testes.

QUADRO 1

Padrões interpretativos para testes de susceptibilidade a antimicrobianos realizados pelo método de Disco-Difusão para *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Acinetobacter</i> spp.		
Agente antimicrobiano	Padrão interpretativo (halo em mm)*					
	Sensível	Intermediário	Resistente	Sensível	Intermediário	Resistente
Ceftazidima	≥18	15 - 17	≤ 14	≥18	15-17	≤ 14
Cefepime	≥18	15 -17	≤ 14	≥18	15-17	≤ 14
Amicacina	≥ 17	15 -16	≤ 14	≥17	15-16	≤ 14
Gentamicina	≥15	13 - 14	≤ 12	≥15	13 -14	≤ 12
Ciprofloxacina	≥21	16 - 20	≤ 15	≥21	16-20	≤ 15
Levofloxacina	≥ 17	14 -16	≤ 13	≥17	14 – 17	≤ 14
Aztreonam	≥22	16 - 21	≤ 32	≥22	16 – 21	≤ 32
Imipenem	≥ 16	14-15	≤ 13	≥ 16	14 -15	≤ 13
Meropenem	≥16	14-15	≤ 13	≥16	14 -15	≤ 13
Piperacilina /tazobactam	≥18	-	≤ 17	≥21	18- 20	≤ 17
PolimixinaB	≥ 12	-	≤ 11	≥ 12	-	≤ 11

* Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011)

4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima das drogas antimicrobianas foi feita pelo método diluição em Ágar, utilizando-se o meio Muller-Hinton (Becton dickinson®, Le Pont de Blaix, FRANÇA), de acordo com recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* e interpretado segundo documento M100-S21 (CLSI, 2011).

Foram analisados os seguintes agentes antimicrobianos (SIGMA-ALDRICH®): Ceftazidima (CAZ), Cefepime (CPM), Amicacina (AMI), Gentamicina (GEN), Ciprofloxacina (CIP),

Levofloxacina (LVX), Aztreonam (ATM), Imipenem (IMI), Meropenem (MER) e Piperacilina/tazobactam (PPT), nas concentrações crescentes de 0,125 - 512 µg/mL e Polimixina B (POL), de 0,125-8 µg/mL. As concentrações testadas abrangeram os pontos de corte interpretativos das CIM para *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., com pelo menos três diluições acima e abaixo, conforme valores estabelecidos pelo documento M100-S21, (CLSI, 2011;Tabela 2).

Soluções estoque de cada antimicrobiano foram preparadas no momento da realização dos ensaios e incorporadas ao ágar MH de acordo com as concentrações desejadas. O inóculo bacteriano foi preparado pelo método de suspensão direta de colônias. Para o mesmo fim, colônias isoladas de culturas puras repicadas em Ágar Triptona de Soja, TSA (Himedia®, MUMBAY-INDIA), incubados por 18 - 24h foram suspensas em em mL salina 0,85% estéril a uma concentração correspondente ao valor de 0,5 da escala de *MacFarland*.

As amostras foram inoculadas nas placas contendo os antimicrobianos com o auxílio de um replicador tipo *Steers*, que transfere 10 µL por ponto, correspondendo a 10⁴ UFC/mL, como preconizado (STEERS *et al.*, 1956). As placas foram incubadas em aerobiose, a 35° C ± 2° C, por 24 horas. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com o documento M100-S21 (CLSI, 2011).

A CIM foi considerada como aquela concentração na qual não foi detectado nenhum crescimento da amostra (CLSI, 2011). Foram realizados pelo menos dois experimentos em duplicata para cada teste amostra testada com cada um dos antimicrobianos, os resultados foram referidos aos dados obtidos em, no mínimo, dois experimentos realizados em duplicata. Discrepâncias entre as duas placas ou entre os dois experimentos motivaram repetição do teste. Foram utilizadas como controle de crescimento, placas sem antimicrobianos e, como controle de qualidade do teste, a amostra de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

QUADRO 2
Padrões interpretativos para determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) para *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Acinetobacter</i> spp.		
Agente antimicrobiano	Padrão interpretativo (concentração em µg/mL)*					
	Sensível	Intermediário	Resistente	Sensível	Intermediário	Resistente
Ceftazidima	≤8	16	≥ 32	≤8	16	≥ 32
Cefepime	≤8	16	≥ 32	≤8	16	≥ 32
Amicacina	≤ 16	32	≥ 64	≤ 16	32	≥ 64
Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacina	≤ 1	2	≥ 4	≤ 1	2	≥ 4
Levofloxacina	≤ 2	4	≥ 8	≤ 2	4	≥ 8
Aztreonam	≤8	16	≥ 32	≤8	16	≥ 32
Imipenem	≤ 4	16	≥ 32	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	≤8	16	≥ 32	≤4	8	≥ 16
Piperacilina /tazobactam	≤64/4	-	≥ 128/4	≤16/4	32/4 - 64/4	≥ 128/4
PolimixinaB	≤ 2	4	≥ 8	≤ 2	-	≥ 4

* Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011)

4.5 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE ENZIMAS RELACIONADAS À RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS

4.5.1 Pesquisa de β-lactamases da classe D (oxacilinases)

A pesquisa fenotípica de oxacilinases foi realizada empregando-se o teste da aproximação de discos, com algumas modificações (DALMARCO *et al.*, 2006).

a) Preparo do inóculo

Uma suspensão bacteriana a partir do meio de cultura TSA foi preparada em solução salina até atingir a turvação correspondente ao ponto 0.5 da escala de *McFarland*, e esta foi inoculada em uma placa de 15 cm de diâmetro contendo ágar Muller-Hinton (BECTONDICKINSON®, Le Pont de Blaix, FRANCE). Em seguida, um disco de amoxicilina/ácido clavulânico foi colocado no centro da placa e, ao redor deste foram distribuídos os antimicrobianos marcadores (aztreonam, cefoxitina, ceftazidima e ceftriaxona) na

distância de 2 cm centímetros de centro a centro, em relação ao disco central, como é mostrado na FIG. 4. As placas foram incubadas a 35°C, por 24 horas.

b) Interpretação

A formação de uma zona fantasma (“Ghost Zone”) entre qualquer antimicrobiano marcador e o disco contendo ácido clavulânico foi considerada indicativa da presença de ESBL.

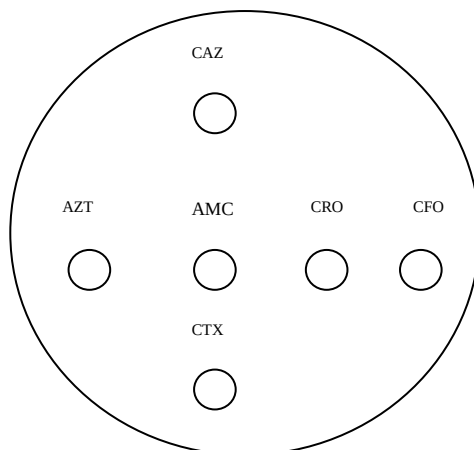


FIGURA 4 - Representação esquemática da montagem da placa para a pesquisa fenotípica de ESBL. CAZ: Ceftazidima, AZT: aztreonam, CRO: ceftriaxona, CTX:cefoxitina.

4.5.2 Pesquisa de β -lactamases da classe C (cefalosporinases)

A pesquisa fenotípica de cefalosporinases foi realizada empregando-se o teste da aproximação de disco, com algumas modificações (YAN *et al.*, 2001; YONG *et al.*, 2002).

a) Preparo do inóculo

Uma suspensão bacteriana foi preparada em solução salina até atingir a turvação correspondente ao ponto 0.5 da escala de *McFarland*, esta foi inoculada em uma placa de 15 cm contendo ágar Muller-Hinton (BECTONDICKINSON®, Le Pont de Blaix,FRANCE). Em seguida, um disco de cefoxitina, ceftazidima (substrato) foi adicionado próximo a um disco de aztreonam (indutor) a uma distancia de 2 cm.

b) Interpretação

O aparecimento de uma zona de entroncamento “truncada”, entre os dois discos foi considerado presuntivo para a presença de ESBL da classe C de Ambler.

4.5.3 Pesquisa de β -lactamases da classe B (metalo- β -lactamases)

Para a pesquisa de Metallo- β -lactamases (MBL), foram utilizados três diferentes métodos fenotípicos: Disco-aproximação (DA), Etest® MBL, Teste de Hodge Modificado (THM).

4.5.3.1 Disco aproximação (DA)

Este teste foi realizado e interpretado segundo ARAKAWA *et al.*, (2000) e YONG *et al.*, (2002), com algumas modificações, de acordo com MENDES e colaboradores, (2006).

a) Preparo do inóculo

Uma suspensão de cada bactéria a ser testada foi preparada em solução salina até atingir a turvação correspondente ao ponto 0.5 da escala de *McFarland*. Em seguida, esta solução foi inoculada em uma placa contendo ágar MH (BECTONDICKINSON®, Le Pont de Blaix, FRANCE) de 15 cm.

b) Inibidores de MBL e substrato.

Os inibidores de MBL utilizados foram o ácido 2-mecaptopropiônico (MPA), ácido 2-mercaptoacético (MAA) e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (SIGMA, Steinheim, GERMANY) nas respectivas concentrações, 11,2 mM, 14,4 mM e 100mM. Como substratos foram utilizados discos de ceftazidima (CAZ - 30 μ g) e imipenem (IMP - 10 μ g) - (Laborclin, São paulo, Brasil).

c) Preparo dos discos de papel filtro

Os discos de papel de filtro foram esterelizados a 121°C, por 15 minutos. As soluções de inibidores de MBL, nas quantidades de: 3 μ l dos ácidos MPA, MAA e 5 μ l de EDTA, foram adicionadas com uma pipeta por cima dos discos estéreis no momento da realização dos testes.

d) Distribuição dos discos nas placas

Os discos de papel de filtro contendo os inibidores MAA, MPA e EDTA foram colocados no centro de cada placa contendo ágar MH previamente inoculada com a suspensão bacteriana. Ao lado de cada um deles, foram colocados os discos de CAZ e IMP a uma distância de 2,5 cm

(centro a centro) dos discos contendo MAA e MPA e a 1 cm (centro a centro) do disco contendo EDTA, conforme representação esquemática demonstrada na FIGURA 5. As placas foram incubadas a 35°C, por 24 horas.

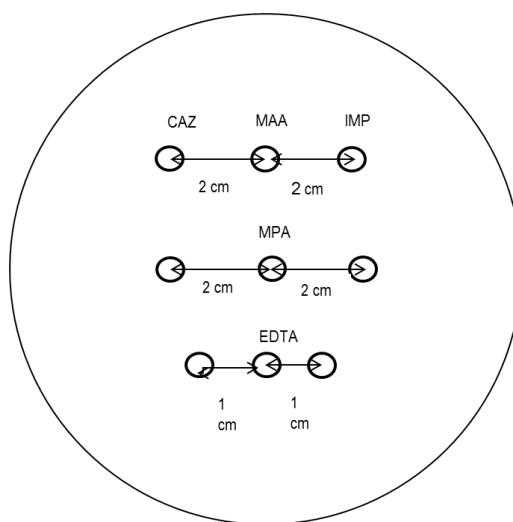


FIGURA 5. Representação esquemática da montagem da placa. CAZ: ceftazidima, IMP: imipenem, MPA: ácido 2-mecaptopropiônico, MAA: ácido 2-mercaptoacético, EDTA: ácido etilenodiaminotetracético.

e) Interpretação

Foram consideradas sugestivas de produtoras de MBL as linhagens que apresentarem sinergismo entre os antimicrobianos CAZ e/ou IMP e, pelo menos, a um dos inibidores utilizados. Em amostras produtoras de MBL observa-se a distorção e a ampliação do halo de inibição de crescimento da bactéria na região do ágar onde houve a difusão do inibidor de MBL. Em testes negativos, não se observa a alteração no halo de inibição de crescimento da bactéria teste.

4.5.3.2 EPSILOMETER TEST (Etest MBL)

a) Preparo do inóculo

Uma suspensão bacteriana foi preparada em solução salina até atingir a turvação correspondente ao ponto 0.5 da escala *McFarland* e inoculada em uma placa de 15 cm contendo ágar Muller-Hinton (BECTONDICKINSON®, Le Pont de Blaix, FRANCE). Em seguida, as fitas de *Etest*/MBL IP/IPI contendo imipenem (IP) em uma das extremidades, em um gradiente que varia de 4 a 256 µg/mL, e imipenem associado ao EDTA (IPI) na outra extremidade, num gradiente que varia de 1 a 64 µg/mL), foram depositadas na superfície do meio e o material foi, incubado a 35 °C, por 24 horas.

c) Interpretação

A amostra foi considerada produtora de MBL quando a relação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) entre IP/IPI foi maior ou igual a oito, e quando houve uma diminuição de 3 diluições entre IP/IPI. O aparecimento de deformação da elipse (aparecimento de uma zona fantasma) também foi considerado como indicativo de produção de MBL e ESBL.

4.5.3.3 Teste de Hodge modificado (THM)

O THM foi realizado e interpretado de acordo com o documento M100-S21, para enterobactérias (CLSI, 2011).

a) Preparo do inóculo e realização do teste

Foi preparada uma suspensão bacteriana a linhagem *Escherichia coli* ATCC 25922 em solução salina como descrito pelas amostras testadas no estudo e o inóculo foi realizado em ágar MH. Em seguida, um disco de IMP-10 μg (LABORCLIN, São Paulo, BRASIL) foi desopositado no centro da placa e, a partir da borda do disco, estriaram-se quatro diferentes amostras bacterianas a serem testadas, em direção à borda da placa. As placas foram incubadas a 35 °C, por 24 horas.

b) Interpretação

Quando houve crescimento da linhagem de *E. coli* ATCC 25922 dentro da zona de inibição do imipenem, observando-se uma zona distorcida a amostra teste foi considerada produtora de carbapenemase. Nos testes considerados negativos, o halo de inibição do imipenem permaneceu inalterado (FIGURA 6).

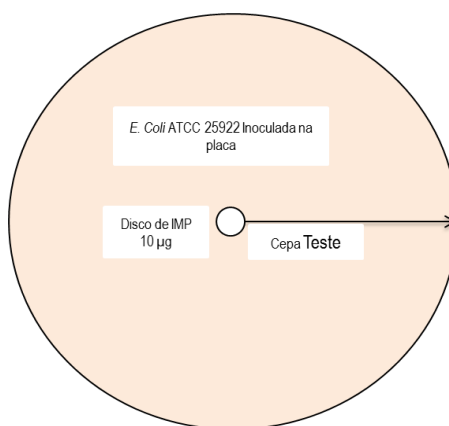


FIGURA 6 . Esquema de realização do teste de Hodge Modificado.

ATCC: American type Culture Collection; IMP: imipenem.

4.6 DETECÇÃO GENOTÍPICA DE β -LACTAMASES

Nesta etapa, foram realizados ensaios para pesquisa dos seguintes genes:

*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{Oxa23}, *bla*_{Oxa24}, *bla*_{Oxa 51} e *bla*_{Oxa58}.

4.6.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

a) Extração do DNA bacteriano

Uma alíquota do crescimento bacteriano foi homogeneizada em 1mL de água milique estéril, até atingir a turvação correspondente ao valor de 0.5 da escala *McFarland*. Em seguida, esta suspensão foi incubada por 10 minutos a 95°C, para extração de DNA, e centrifugada sob refrigeração a 4°C por 30 segundos a 9000 rpm (GALES *et al.*, 2003, HAMMAMI *et al.*, 2011). Após a centrifugação, o sobrenadante que é a parte que tem o DNA foi quantificado em um Nanodrop.

b) Preparo do Master-Mix

Utilizou-se nesta etapa o kit Master Mix (PROMEGA®, Madison, USA) contendo: 500 units/mL de Taq DNA polimerase, 400µM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 3mM de MgCl₂.

Cada reação ocorreu em um volume final de 25 µL sendo 12,5 µL de Master Mix + 1,5 µL de *primers* + 100 ng de DNA bacteriano + água livre de nuclease, para completar o volume de 25 µL.

c) Condições de amplificação do DNA

As condições para a reação de amplificação dos genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{VIM-1}, ocorreram segundo YAN *et al.* (2001), com modificações:

- 94°C iniciais por 1 minuto, seguidos de 30 ciclos de:
- Desnaturação a 94°C, por 1 minuto
- Anelamento a 54°C, por 1 minuto
- Extensão a 72°C, por 1 minuto
- 72°C finais por 6 minutos.

Para os genes *bla*_{SIM-1}, as condições foram (LEE *et al.*, 2005):

- 94°C iniciais por 5 minutos, seguidos de 25 ciclos de:
- Desnaturação a 94°C, por 30 segundos
- Anelamento a 56°C, por 30 segundos
- Extensão a 72°C, por 45 segundos
- 72°C finais por 7 minutos.

Para os genes *bla*_{AmpC}, as condições ocorreram segundo COUDRON *et al.*, 2000:

- 95°C iniciais por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de;
- Desnaturação a 94°C, por 1 minuto
- Anelamento a 57°C, por 1 minuto
- Extensão a 72°C, por 2 minutos
- 72°C finais por 5 minutos.

Para os genes *bla*_{OXA-23, 24, 51, 58}, as condições foram feitas de acordo com WOODFORD *et al.*, 2006 (Multiplex):

- 94°C iniciais por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de;
- Desnaturação a 94°C, por 25 segundos
- Anelamento a 52 °C, por 40 segundos
- Extensão a 72°C, por 50 segundos
- 72°C finais por 6 minutos.

d) Iniciadores utilizados

As sequências dos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes, assim como o tamanho dos produtos esperados, são mostrado na Quadro 3.

QUADRO 3

Iniciadores e tamanho dos produtos esperados utilizados para a detecção genotípica de β -lactamases.

Genes	Iniciadores	Produto esperado (pb)	Referencia
<i>bla_{SPM-1}</i>	5'- AAAATCTGGGTACGCAAACG – 3' 5' - ACATTATCCGCTGGAACAGG - 3'	271 pb	Yan <i>et al.</i> , 2001
<i>bla_{IMP-1}</i>	5'- GAATAGAGTGGCTTAAGTCTC – 3' 5' - AGATAACCTAGTGGTTTGG – 3'	189 pb	Yan <i>et al.</i> , 2001
<i>bla_{VIM-1}</i>	5' - CGAATGCGCAGCACACG – 3' 5' - CTGGTGCTGCGCATTCG - 3'	390 pb	Yan <i>et al.</i> , 2001
<i>bla_{GIM-1}</i>	5'- TCGACACACCTTGGTCTGAA – 3' 5' - AACTTCCAACCTTGCCATGC – 3'	477 pb	Yan <i>et al.</i> , 2001
<i>bla_{SIM-1}</i>	5'- TACAAGGGATTGCGCATCG – 3' 5'- TAATGGCCTGTTCCCATGTG – 3'	571 pb	Lee <i>et al.</i> , 2005
<i>bla_{AmpC}</i>	5' - CAGTAGCGAGACTGCGCA – 3' 5'- ATAACCACCCAGTCACGC – 3'	631 pb	Sompolinsky <i>et al.</i> , 2005 Coudron <i>et al.</i> , 2000
<i>bla_{Oxa23}</i>	5 - GATCGGATTGGAGAACCAGA -3' 5'- ATTTCTGACCGCATTTCCAT – 3'	501 pb	Woodford <i>et al.</i> , 2006
<i>bla_{Oxa24}</i>	5' - GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA – 3' 5' - AGTTGAGCGAAAAGGGGATT – 3'	246pb	Woodford <i>et al.</i> , 2006
<i>bla_{Oxa51}</i>	5' - TAATGCTTTGATCGGCCTTG -3' 5' - ATTTCTGACCGCATTTCCAT - 3'	353 pb	Woodford <i>et al.</i> , 2006
<i>bla_{Oxa58}</i>	5'- AAGTATTGGGGCTTGTGCTG – 3' 5'- CCCCTCTGCGCTCTACATAC – 3'	599 pb	Woodford <i>et al.</i> , 2006

e) Eletroforese

Realizou-se a eletroforese dos produtos obtidos por PCR em gel de agarose 2% em Tampão TAE para as bandas de tamanho de 189 pb, 271 pb e 390 pb (1,6g+ 80 mL tampão TAE) e 1,5%, para as bandas de tamanhos 477 pb, 571 pb, 631 pb, 501 pb, 246 pb, 599 pb (1,2 g + 80 mL tampão TAE).

O tempo de corrida foi de, aproximadamente, 120 minutos a 90 volts. Os géis foram submersos no tampão de coloração (15µl Gel red 10.000 X (BIOTIUM ,TM Hayward, USA) + 45 mL de água + 5 mL NaCl) sob agitação, durante 30 minutos, e as imagens foram capturadas

sob luz ultravioleta em um fotodocumentador. Como padrão, utilizou-se o marcadores de 50 e 100 pb DNA ladder (PROMEGA®, Madison, USA).

4.7 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DAS AMOSTRAS

A caracterização dos perfis genéticos das amostras bacterianas foi obtida pela análise do polimorfismo do DNA após amplificação por reação da polimerase em cadeia, utilizando iniciadores aleatórios (RAPD) e iniciadores para sequências conservadas intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR).

4.7.1 Análises por *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)

Para a análise por RAPD das amostras de *P. aeruginosa*, de acordo com DABROWSKI *et al.* (2003), os iniciadores foram CagA1 e CMVin2, descritos na Quadro 4.

a) Condições de amplificação do DNA

As condições para a reação de amplificação foram propostas por descritas por DABROWSKI *et al.*, (2003)

- 94°C iniciais por 2 minutos, seguidos de 5 ciclos de:
- Desnaturação a 94°C, por 30 segundos
- Anelamento a 30°C, por 5 minutos
- Extensão a 72°C, por 1 minuto, seguidos de 25 ciclos de:
- Desnaturação a 94°C, por 30 segundos
- Anelamento a 30°C, por 1 minuto
- Extensão a 72°C, por 1 minuto
- 72°C finais por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%.

4.7.2 Análise das sequências intergênicas repetitivas consenso enterobacterianas – ERIC

As amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* foram analisadas por ERIC PCR, de acordo com SILBERT *et al.*, 2004. Os iniciadores utilizados foram ERIC1R e ERIC2, descritos na tabela 4.

a) Condições de amplificação do DNA

As condições para a reação de amplificação foram propostos por SILBERT *et al.*, (2004) e empregadas com algumas modificações:

- 95°C iniciais por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de:
- Desnaturação a 90°C por 30 segundos
- Anelamento a 52°C por 1 minuto
- Extensão a 65°C por 8 minutos

b) Eletroforese

Realizou-se a eletroforese dos produtos obtidos pela PCR em gel de agarose 1,5%. A corrida foi de, aproximadamente, 120 minutos, a 90 volts.

QUADRO 4

Iniciadores utilizados para a análise por RAPD e ERIC-PCR

Iniciadores	Sequências	Referências
CagA2	5` ATT TAG AAG CAG GCT TTA GC 3`	DABROWSKI <i>et al.</i> , 2003
CMVin2	5`GGT AGC AC GCG GGT TTC GAC 3`	DABROWSKI <i>et al.</i> , 2003
ERIC1 R	5` TGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3`	SILBERT <i>et al.</i> , 2004
ERIC2	5`AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3`	SILBERT <i>et al.</i> , 2004

ERIC:enterobacterialrepetitiveintergenic consensus; RAPD:random amplification of polymorphic DNA

c) Interpretação dos resultados

Os resultados foram analisados por inspeção visual e computadorizada. Para a análise visual, os padrões de banda observados foram comparados dois a dois e classificados como tipos diferentes pela observação de uma ou mais bandas distintas. A análise computadorizada foi feita com o auxílio do programa NTSYS v. 2.1 (ROHLF, 2000), utilizando-se o índice de Dice e o método “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages” (UPGMA).

Os padrões gerados por ERIC-PCR foram interpretados usando-se a taxonomia numérica e um sistema de análise multivariada (NTSYS versão 2.1, Exeter Software, Newyork, NY, EUA). As amostras foram consideradas tendo o parentesco de mesmo DNA se o coeficiente de correlação de Dice foi > 0,90.

4.8 Controle de qualidade

Amostras de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *Enterobacter cloacae* produtoras das enzimas SPM-1, pelo método fenotípico, foram sequenciadas e, após confirmação da presença do gene correspondente, foram utilizadas como controle positivo. Para os demais iniciadores, foram utilizadas amostras controle gentilmente cedidas pela Dra. Mara Correa Lelles Nogueira, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto. Como controle negativo para todos os testes fenotípicos, foram usadas as amostras de referência *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922.

4.8.1 Sequenciamento das amostras empregadas como controle na PCR para detecção do gene *bla_{SPM-1}*

a) Reação em Cadeia pela Polimerase

Cada reação ocorreu num volume final de 25 µL, sendo 12,5 µL de Master Mix acrescido de 1,5 µL dos iniciadores 5'-AAAATCTGGGTACGCAAACG-3' e 5'-ACATTATCCGCTGGAACAGG-3' que amplificam o gene de resistência *bla_{SPM-1}*, como previamente descrito por YAN *et al.*, 2001. Como molde, foi utilizado 100 ng do DNA bacteriano. As condições para a reação de amplificação empregadas foram descritas por YAN *et al.* (2001), com algumas modificações: 94°C iniciais por 1 minuto, seguidos de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C, por 1 minuto; anelamento a 54°C, por 1 minuto; extensão a 72°C, por 1 minuto e uma extensão final de 72°C, por 6 minutos.

A análise eletroforética dos produtos amplificados foi feita em gel de agarose 2% em tampão de Tris-Acetato EDTA (TAE 1x) durante, aproximadamente, 120 minutos, a 90 volts. Após coloração o fragmento específico, de 271 pb foi recortado do gel com lâmina de bisturi estéril e colocado em tubos de microcentrifuga. A purificação foi feita usando-se o GFXTM PCR DNA e *gel band purification* kit (Amersham), segundo as orientações do fabricante. Os produtos purificados foram quantificados em espectrofotômetro Nanodrop e sequenciados.

c) Reação de sequenciamento para confirmação da presença do gene *bla_{SPM-1}*

O sequenciamento dos produtos purificados das amostras 1185 e 4122 foi feito pelo método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977), em ambas as direções da dupla fita (senso positivo e senso negativo), no mínimo duas vezes, empregando-se os iniciadores descritos por YAN *et al.*, (2001). Os sequenciamentos foram feitos no Núcleo de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) utilizando-se o “kit DyEnamicTM ET DyeTerminator” no sequenciador automático MegaBaceTM 1000 (AmershamBiosciences).

b) Análise Computacional das Sequências

Os eletroferogramas obtidos foram analisados no programa ChromasPro (Technelysium Pty. Ltd - <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). A similaridade das sequências nucleotídicas obtidas foi verificada com o auxílio do programa BLASTn do pacote BLAST 2.0 (*Basic Alignment Search Tool* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Também foram selecionadas três sequências de estirpes de referência de *Pseudomonas* e uma sequência de *A. baumannii*, utilizadas nas análises comparativas. As sequências obtidas foram alinhadas através do programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Confirmação da identificação fenotípica das amostras

Observou-se que 88,8% (40/45) das amostras previamente identificadas como *P. aeruginosa* e 98,46% (64/65) identificados como *A. baumannii* tiveram sua identificação confirmada (TAB. 5).

TABELA 1
Confirmação da identificação das amostras oriundas de hemoculturas, dos cinco hospitais de Belo Horizonte pelo sistema automatizado VITEK® 2.

Amostras bacterianas		
Identificação prévia nos hospitais (n)	Identificação no MOA	n (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (45)	<i>P. aeruginosa</i>	40 (88,8)
	<i>A. baumannii</i> complexo (cpx)	2 (4,4)
	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2 (4,4)
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1 (1,5)
<i>Acinetobacter</i> spp. (65)	<i>A. baumannii</i> cpx	64 (98,5)
	<i>Serratia marcescens</i>	1 (1,5)

MOA: Laboratório Microbiologia Oral e Anaeróbios.

Do total de 40 amostras de *P. aeruginosa* e 64 de *A. baumannii* multirresistentes a drogas incluídas neste estudo, a maioria foi oriunda de Centros de Terapia Intensiva, dos Hospitais Semper, Santa Casa, Odilon Behrens, Clínicas e João XXIII com porcentagens de 1 (2,5%), 3 (7,5%), 6 (15%), e 7 (17,5%), respectivamente. Os dados referentes a outros setores de cada hospital são mostrados na TAB 2. Das amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, 43% e 69%, respectivamente, eram oriundas de centros de terapia intensiva e 43% e 22%, respectivamente, eram oriundas das enfermarias. As porcentagens dos outros setores são mostradas no GRAF. 1.

TABELA 2
Distribuição setorial das 104 amostras de *P.aeruginosa* e *A.baumannii* isoladas de hemoculturas de cinco hospitais de Belo Horizonte.

Hospital	Setor	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
Semper	CTI	3 (7,5%)	8 (12,5%)
Santa Casa	CTI	6 (15,0%)	12 (18,75%)
	ONCO	1 (2,5%)	0
	ENF	2 (5%)	0
Odilon Behrens	CTI- PED	0	2 (3,12 %)
	CTI	1 (2,5%)	10 (15,62%)
	ENF	3 (7,5%)	2 (3,12%)
Clínicas	CTI	0	9 (14,06%)
	ENF	7 (17,5%)	2 (3,12%)
João XXIII	CTI	7 (17,5%)	2 (3,12%)
	UTQ	5 (12,5%)	6 (9,37%)
	CTI-PED	0	1 (1,56%)
	ENF	5 (12,5%)	10 (15,62%)
TOTAL		40 (100%)	64 (100%)

CTI: centro de terapia intensiva, ONCO: oncologia, CTI-PED: centro de terapia intensiva pediátrica, UTQ: unidade de terapia de queimados, ENF: enfermarias.

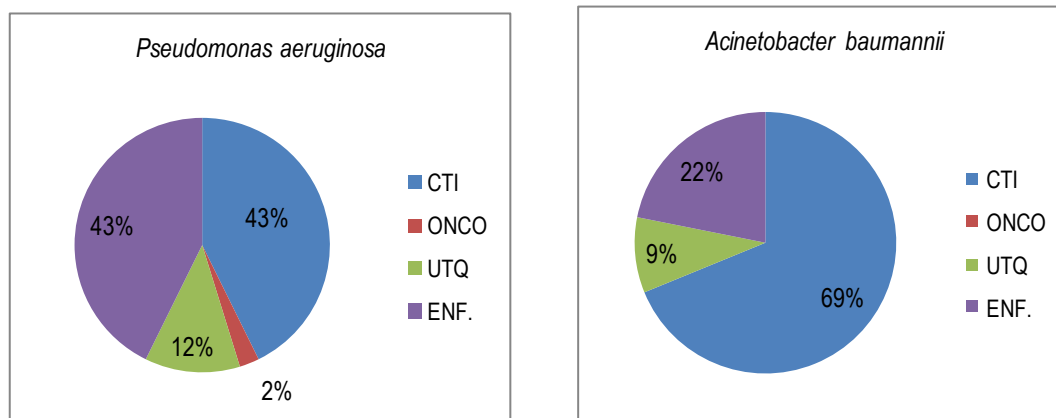


GRÁFICO 1 - Distribuição geral das amostras de *P. aeruginosa* e de *A.baumannii* isoladas de hemoculturas. CTI: centro de terapia intensiva; ONCO: oncologia; UTQ: unidade de terapia de queimados; ENF: enfermarias.

P.aeruginosa e *A. baumannii* são bastonetes Gram negativos não fermentadores que se destacam por sua grande versatilidade metabólica e podem ser encontrados em vários ambientes, inclusive hospitalares. A importância clínica de infecções causadas por estas bactérias esta associada à expressão de resistência múltipla a antimicrobianos associada a uma difícil erradicação da doença e, conseqüentemente, a elevados índices de morbidade e mortalidade, particularmente em pacientes com doenças de base grave (LIVERMORE, 1995; BUSH-JACOBY, 2010).

Nossos resultados confirmaram, nos níveis de gênero e espécie, 88,8% (40/45) das amostras anteriormente identificadas como *P. aeruginosa*; porém, cinco amostras não corresponderam, duas sendo identificadas como complexo *A. baumannii*, duas como *Ochrobactrum anthropi* e uma como *Sphingomonas paucimobilis*, que também pertencem ao grupo dos bastonetes Gram negativo não fermentadores.

Com relação à origem das amostras, a maioria (75%) foi oriunda de centros de cuidados especiais, como unidades e centros de terapia intensiva (UTI/CTI), unidade de terapia de queimados (UTQ) e oncologia (Tabela 6, anexos A e Aa). Do total das amostras de *P. aeruginosa*, 42,5% eram procedentes de UTI/CTI, 12,5% de UTQ, 30% de enfermarias e 15% de ambulatorios (Anexo A). Da mesma forma, a maioria (76,56%) das amostras de *A. baumannii* foi proveniente de UTI/CTI, seguida das enfermarias (18,75%) e de ambulatorios (4,7%) (Anexos Aa).

De acordo com a literatura, pacientes sob hospitalização em UTI apresentam uma incidência desproporcionalmente maior de infecções nosocomiais da corrente sanguínea, se comparados aos pacientes em outras áreas de internação (MARTIN *et al.*, 2003; MASEDA *et al.*, 2011), resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo. Estas unidades têm sido o epicentro da resistência bacteriana aos antimicrobianos (EMORI & GAYNES, 1993; SABATIER, 2009, MASEDA *et al.*, 2011). O uso de procedimentos invasivos, diagnósticos ou terapêuticos, a contaminação de dispositivos artificiais, a difícil implementação de técnicas básicas de controle de infecção, em muitos casos, e a prevalência de microrganismos resistentes a múltiplas drogas antimicrobianas têm contribuído significativamente para o aumento desta ocorrência (SABATIER, 2009; MASEDA *et al.*, 2011).

5.2 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade a antimicrobianos por disco-difusão (DD) e diluição em ágar/determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* mostraram taxas de resistência significativas a todas as drogas testadas. Os resultados dos testes de DD e CIM podem ser observados nos Gráficos 2 e 3. As amostras de *P. aeruginosa* apresentaram níveis de resistência elevados à maioria dos antimicrobianos, num intervalo de 12,5% a 55%. Quanto às amostras de *A. baumannii*, observaram-se taxas de resistência mais elevadas em relação as amostras de *P. aeruginosa*, variando de 17,18% a 98,4% pelos métodos da CIM e DD.

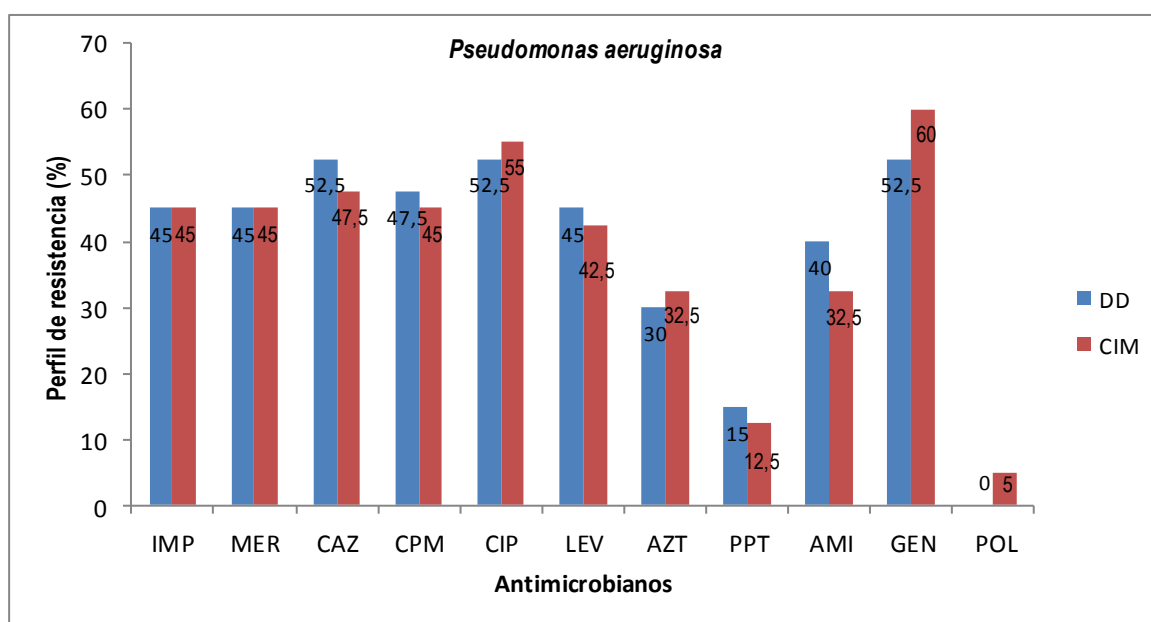


GRÁFICO 2 - Perfil de resistência das 40 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de hemocultura de pacientes dos cinco hospitais em estudo. IMI: Imipenem, MER: Meropenem, CAZ: Ceftazidima, CPM: Cefepime, ATM: Aztreonam, PPT: Piperacilina /Tazobactam, CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina, AMI: Amicacina, GEN: Gentamicina, POL: Polimixina B, DD: disco-difusão, CIM: concentração inibitória mínima.

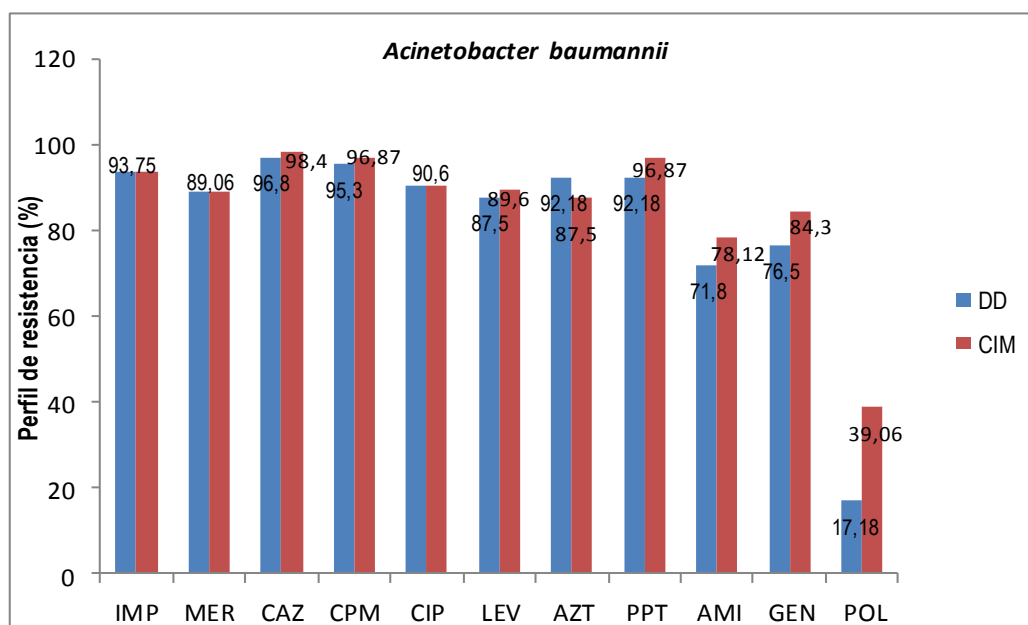


GRÁFICO 3 - Perfil de resistência das 64 amostras de *A. baumannii* isoladas de hemocultura de pacientes dos cinco hospitais em estudo. IMI: Imipenem, MER: Meropenem, CAZ: Ceftazidima, CPM: Cefepime, ATM: Aztreonam, PTZ: Piperacilina /Tazobactam, CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina, AMI: Amicacina, GEN: Gentamicina, POL: Polimixina B, DD: disco-difusão, CIM: concentração inibitória mínima.

Os resultados dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos por DD e CIM de acordo com os hospitais e setores participantes são apresentados nas TAB. 3 e 4, podendo-se observar as variações das porcentagens de resistência, considerando cada hospital e setor em estudo, destacando-se a resistência de 100% das amostras para várias drogas. Observou-se discrepância entre os dois métodos para alguns antimicrobianos como, por exemplo, a Polimixina B, para a qual os dados da CIM são mais objetivos e expressivos que aqueles da DD, talvez pelo facto de que o CLSI não preve padrões interpretativos para esse antimicrobiano no método de DD, e os resultados obtidos foram interpretados com os valores interpretativos de *P. aeruginosa*.

Diversos autores vêm citando alguns dos motivos técnicos que interferem nos resultados, como: inóculos mais carregados (acima do padrão 0,5 da escala Mac Farland), que fornecem resultados falsamente diminuídos, e inóculos mais diluídos, que geram resultados falsamente aumentados; a pré-incubação da placa em estufa por 5 minutos após a inoculação com o swab, que é importante para remover o excesso de umidade, que pode causar a difusão errática do antimicrobiano após a implantação dos discos; a observação do tempo necessário para que os materiais atinjam a temperatura ambiente no momento do uso; a qualidade da estocagem; o preparo do meio de cultura e antimicrobianos fora de validade. Todos estes fatores podem resultar em leitura e interpretação incorretas dos resultados.

TABELA 3

Perfil de resistência das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (n=40) e *Acinetobacter baumannii* (n= 64) isoladas de hemoculturas, por Hospitais participantes.

Antimicrobianos Resistência (%)																						
	IMP		MER		CAZ		CPM		CIP		LEV		AZT		PPT		AMI		GEN		POL	
<i>A.baumannii</i>	DD	CIM	DD	CIM	DD	CIM	DD	CIM	DD	CIM	DD	CIM	DD	CIM	DD	CIM	DD	CIM	DD	CIM	DD	CIM
SP	100	100	100	100	100	88	100	100	75	75	75	62,5	100	100	100	100	88	87,5	88	87,5	0	63
SC	100	100	91,6	100	92	92	83	91,6	92	100	92	66,6	83	83,3	91,6	91,6	83	83,3	83	83,3	33	50
OB	71,4	71	71,4	71,4	93	86	93	92,8	86	85,7	79	71,4	86	85,7	92,8	92,8	64	57,1	71	64,2	7,1	57
HC	100	91	90,9	90,9	100	91	100	90,9	91	90,9	100	63,6	100	100	100	90,9	73	72,7	82	63,6	45	45
JXXIII	100	89	89,4	89,4	100	100	100	100	100	100	95	94,7	89	89,4	84,2	94,7	63	73,6	68	68,4	5,2	5,2
<i>P.aeruginosa</i>																						
SP	0	33	0	33,3	33	67	33	66,6	33	66,6	33	66,6	100	100	66,6	66,6	67	33,3	33	33,3	0	0
SC	55,5	44	55,5	33,3	56	56	44	44,4	67	55,5	67	44,4	56	55,5	22,2	22,2	22	0	56	44,4	0	0
OB	25	25	25	25	25	25	25	25	50	50	25	25	25	25	0	0	0	0	25	25	0	0
HC	14,2	14	14,2	14,2	29	29	29	28,5	29	28,5	14	14,2	0	0	0	0	14	14,2	29	42,8	0	0
JXXIII	58,8	59	58,8	58,8	41	35	41	52,9	53	58,8	53	41,1	18	11,7	5,8	112	41	29,4	71	70,5	0	5

SP: Hospital Semper; OB: Hospital Odilon Behrens; SC: Santa Casa; HC: Hospital das Clínicas; JXXIII: Hospital João XXIII IMI: Imipenem, MER: Meropenem, CAZ: Ceftazidima, CPM: Cefepime, ATM: Aztreonam, PPT: Piperacilina /Tazobactam, CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina, AMI: Amicacina, GEN: Gentamicina, POL: Polimixina B, DD: disco-difusão, CIM: concentração inibitória mínima.

TABELA 4
 Perfil de resistência das amostras de *P. aeruginosa* (n=40) e *A. baumannii* (n=64) isoladas de hemoculturas, por setores.

	Antimicrobiano Resistência (%)										
<i>P. aeruginosa</i>	IMP	MER	CAZ	CPM	AZT	PPZ	CIP	LEV	AMI	GEN	POL
CTI (n=18)	55,5	22,2	50	66,6	27,7	27,7	38,8	33,3	38,8	61,1	2,5
UTQ (n= 4)	25	0	25	25	0	0	25	25	50	50	0
ONCO (n=1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENF (n= 17)	23,5	0	41,1	35,2	11,7	0	11,7	5,85	23,5	41,1	2,5
<i>A. baumannii</i>											
CTI (n=41)	95,1	92,6	95,1	97,5	80,4	100	97,5	95,1	73,1	68,2	39
UTQ (n= 6)	66,6	83,3	66,6	66,6	66,6	66,6	66,6	66,6	83,3	83,3	100
CTI-PED (n=3)	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	66,6	33,3	33,3	66,6	33,3	33,3
ENF (n= 14)	92,8	92,8	100	100	85,7	100	92,8	92,8	85,7	64,2	7,3

CTI: centro de terapia intensiva; ONCO: oncologia; CTI-PED: centro de terapia intensiva pediátrica, UTQ: unidade de terapia de queimados; ENF: enfermagem, IMI: Imipenem, MER: Meropenem, CAZ: Ceftazidima, CPM: Cefepime, ATM: Aztreonam, PTZ: Piperacilina /Tazobactam, CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina, AMI: Amicacina, GEN: Gentamicina, POL: Polimixina B, CIM: concentração inibitória mínima.

A menor concentração dos antimicrobianos testados capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras (CIM₉₀) foi superior ao ponto crítico tanto para as amostras de *P. aeruginosa*, como para *Acinetobacter* spp., para quase todas as drogas. Com relação à CIM₅₀, observa-se uma variação especialmente em *P. aeruginosa*. Todas as amostras de *P. aeruginosa* foram sensíveis à Polimixina B, sendo a CIM₉₀ de 0,5 µg/mL e CIM₅₀ 0,25 µg/mL. Para *A. baumannii* a CIM₉₀ de polimixina B encontra-se exatamente no ponto de corte (8 µg/mL) e a CIM₅₀, 0,25 µg/mL Tabela 5.

TABELA 5
CIM₅₀ e CIM₉₀ das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (n=40) e *Acinetobacter baumannii* (n=64)
multirresistentes isoladas de hemoculturas em cinco hospitais de Belo Horizonte.

	<i>A. baumannii</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
Concentração Inibitória Mínima (CIM): µg/mL				
Antimicrobianos	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀
IMP	128	256	4	64
MER	32	64	2	16
CAZ	512	512	8	256
COM	128	512	8	128
CIP	64	256	0,125	64
LEV	8	16	1	32
AZT	64	64	4	16
PTZ	512	512	16	64
AMI	32	128	4	64
GEN	256	512	32	512
POL	2	8	0,25	0,5

CIM₉₀: Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras CIM₅₀:
Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras, IMI: Imipenem, MER:
Meropenem, CAZ: Ceftazidima, CPM: Cefepime, ATM: Aztreonam, PTZ: Piperacilina/Tazobactam, CIP:
Ciprofloxacina,
LEV: Levofloxacina, AMI: Amicacina, GEN: Gentamicina, POL: Polimixina

No presente estudo, os testes de susceptibilidade a antimicrobianos mostraram elevados índices de resistência das amostras avaliadas, não apenas aos agentes β-lactâmicos, mas também às outras classes de drogas. As menores concentrações de todos os antimicrobianos testados, capazes de inibir o crescimento de 90% e 50% (CIM₉₀ e CIM₅₀) das amostras de *A.baumannii* avaliadas foram superiores aos respectivos pontos críticos. Comportamento semelhante foi observado entre as amostras de *P.aeruginosa*, para as quais a CIM₉₀ foi maior que o ponto crítico para todos os antimicrobianos testados e a CIM₅₀ para a maioria deles.

O estudo epidemiológico nacional *SENTRY* (*Antimicrobial Surveillance Program*), direcionado a pacientes hospitalizados, avaliou 3.728 amostras bacterianas, Gram positivas e Gram negativas, obtidas de 12 centros hospitalares de quatro estados brasileiros, apontando *P. aeruginosa* como responsável por 496 (13,3%) casos de infecções diversas e como o terceiro patógeno mais frequente, sendo 30,2% destas amostras resistentes ao imipenem (SADER *et al.*, 2001).

Um estudo do programa MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Information Collection*), específico para avaliação epidemiológica em UTIs, analisou 1.550 amostras de bactérias Gram negativas, provenientes de 20 centros hospitalares brasileiros, observando que *P. aeruginosa* estava envolvida em 30,3% (470 amostras) das infecções de corrente sanguínea, cateter, trato respiratório, trato urinário, pele e tecidos moles, sendo 36,6% destas resistentes ao imipenem (KIFFER *et al.*, 2005).

No Brasil, como em muitas partes do mundo, os surtos de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. e *P.aeruginosa* multirresistentes têm sido frequentemente relatados. Estudo recente sobre a caracterização molecular de amostras de *Acinetobacter* spp. multirresistentes a drogas em Porto Alegre mostrou que 69% destas foram resistentes aos carbapenêmicos (FERREIRA *et al.*, 2011). RODRIGUES e colaboradores (2011) analisando a diversidade genética de *P. aeruginosa* proveniente de UTIs em Campo Grande, Mato Grosso do Sul mostraram que, do total de 40 amostras, 72,5% foram resistentes à ceftazidime e 92,5% ao imipenem.

Estudos, realizados no Sul e Centro-Oeste do País, relataram percentuais de resistência ao meropenem de 58,9% a 82,7%, respectivamente (GONÇALVES, 2009). Yong e colaboradores (2005) observaram que 28% das amostras *P. aeruginosa* isoladas de diferentes processos infecciosos, também no Brasil, foram resistentes à ceftazidima, assim como à ticarcilina, à associação ticarcilina/ácido-clavulânico, à cefpiroma e ao cefepime.

Em nossos resultados, as taxas de resistência entre as amostras de *A. baumannii* avaliadas foram de 93,75% ao imipenem pelos métodos de DD e CIM e, 89,5% ao meropenem por ambos os métodos. Observou-se que 45% das amostras de *P. aeruginosa*, eram simultaneamente resistentes ao imipenem e ao meropenem pelos dois métodos (Anexo B). Além do elevado número de amostras resistentes aos β -lactâmicos, verificou-se, também, resistência às quinolonas e aminoglicosídeos em *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, a saber: ciprofloxacina, 90,6% e 55%; levofloxacina, 89,06% e 42,5%; amicacina, 78,12% e 32,5%; e gentamicina, 84,3% e 60%, respectivamente.

Os resultados dos dois métodos utilizados (DD e CIM) mostraram perfis de resistência semelhantes para a maioria das drogas. As maiores variações em *P. aeruginosa* foram observadas com amicacina (40% - 32,5%) e gentamicina (52,5% - 60%). Em *A. baumannii*, foram de 17,18% a 39,06%, para polimixina B, e de 76,5 % a 84,3%, para gentamicina.

Os carbapenêmicos (imipenem e meropenem) são antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro, vastamente utilizados no tratamento de infecções provocadas por amostras multirresistentes de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Possuem considerável estabilidade diante da maioria das β -lactamases, incluindo as de amplo espectro (ESBL); por essa razão, os carbapenêmicos ainda são considerados fármacos importantes no tratamento de infecções hospitalares causadas por bactérias Gram negativas resistentes aos demais β -lactâmicos ou a outros antibacterianos (LIVERMORE, 1995; BUSH-JACOBY, 2010).

A maior utilização de carbapenêmicos no ambiente hospitalar acaba por ocasionar maior pressão seletiva sobre a microbiota nosocomial, o que favorece a seleção de subpopulações de microrganismos com sensibilidade diminuída ou resistente a esses antimicrobianos. Atualmente, amostras bacterianas de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes à grande maioria dos agentes antimicrobianos e sensíveis somente à polimixina B têm sido isoladas pelos laboratórios de microbiologia clínica, na maior parte dos hospitais brasileiros (MENDES *et al.*, 2006), corroborando os resultados encontrados neste estudo.

No entanto, a produção de enzimas tipo MBL por alguns patógenos é motivo de preocupação mundial, sendo notável pelo seu amplo espectro de atividade contra a maioria dos agentes β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos e, também, pela resistência que essas enzimas apresentam aos inibidores de β -lactamases (OLIVEIRA, 2007; CORNAGLIA *et al.*, 2011). As MBL hidrolisam todos os β -lactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção os monobactâmicos, como o aztreonam (AMBLER, 1980; BUSH *et al.*, 1995; WALSH 2010; CORNAGLIA *et al.*, 2011).

O aztreonam foi um dos antimicrobianos que mostraram atividade *in vitro* sobre as amostras de *P. aeruginosa*, com índice de sensibilidade de 67,5%. Este perfil é compatível com a produção de MBL, pois o aztreonam não é hidrolisado por estas enzimas. No entanto, nossos resultados mostraram que 32,5% das amostras de *P. aeruginosa* foram resistentes ao aztreonam, sugerindo possível associação com outros mecanismos de resistência ou, ainda, a produção de outras β -lactamases. Já em *A. baumannii*, 87,5% das amostras foram resistentes ao aztreonam, o que se deve à diversidade de enzimas carregadas por esses microrganismos e outros mecanismos de resistência.

Estudo sobre a determinação da produção de MBL em amostras de *P.aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba detectou um percentual de resistência de 19,7% (39/198) ao imipenem e de 15,2% (30/198) à ceftazidima, com 10,1% (20/198) de resistência cruzada aos

dois antimicrobianos. Entre estas amostras, 2% (4/198) mostraram produção fenotípica de MBLs (SANTOS FILHO *et al.*, 2002).

Em nossos estudo, observou-se a produção de MBL em 45% (18/40) das amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e ao meropenem. Além da resistência aos carbapenêmicos, também mostraram resistência às cefalosporinas, aos aminoglicosídeos e às quinolonas. Por outro lado, 42,5% das amostras de *P. aeruginosa* que não apresentaram resistência aos carbapenêmicos também carregavam consigo os genes de MBL.

Amostras de *P.aeruginosa* e *A. baumannii* produtoras de MBL são frequentemente resistentes a todas as opções de tratamento; logo, drogas como a polimixina B acabam sendo utilizadas com bastante frequência como escolha terapêutica, apesar da sua toxicidade (LIVERMORE, 2002; FALAGATAS *et al.*, 2010). Em nossos resultados, observou-se resistência intermediária à polimixina B em 5% (2/40) das amostras de *P. aeruginosa*, sendo as CIM₅₀ e CIM₉₀ para este antimicrobiano de 0,25µg/mL e 0,5 µg/mL, respectivamente. Já em *A. baumannii*, observou-se resistência de 39% destas amostras, com valores de 2 µg/mL e 8µg/mL para CIM₅₀ e CIM₉₀, respectivamente Tabela 5.

As cefalosporinas (cefepime e ceftazidima e outros) têm sido consideradas importantes antimicrobianos no formulário para hospitais, em muitos países, sendo prescritos para uma grande variedade de infecções e apresentando uma boa eficácia, tanto sobre bactérias Gram positivas como Gram negativas. Seu sucesso indubitável tem relação com sua menor capacidade alergênica e riscos de toxicidade, bem como seu largo espectro de atividade (DANCER, 2001). Esses antimicrobianos são, contudo, alvos de muitas β-lactamases, como as cefalosporinases, carbapenemases e metalo-β-lactamases, que respondem pela resistência destas bactérias aos antimicrobianos. No presente trabalho, os resultados mostraram índices de resistência de 52,5% e 47,5% das amostras de *P. aeruginosa* a CAZ e 47,5% e 45 % para CPM, pelos dois métodos utilizados, respectivamente. Para as amostras de *A. baumannii*, a resistência foi de 96,8% e 98,4% para o CAZ, e de 95,3 e 96,87 para COM, pelos dois métodos em estudo, respectivamente.

A aquisição de material genético, que ocorre de forma natural intra ou interespecies entre os bastonetes Gram negativos, é apontado como um dos principais responsáveis pela aquisição e disseminação de determinantes de resistência. Do mesmo modo, a capacidade que

P. aeruginosa e *A. baumannii* apresentam de se tornarem resistentes ao antimicrobiano durante o tratamento é inerente às espécies e, muitas vezes, inevitável (LINCOPAN *et al.*, 2005).

5.3 Detecções fenotípicas de enzimas relacionadas à resistência a antimicrobianos em *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp.

A resistência aos carbapenêmicos tem sido observada principalmente em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, e é decorrente de múltiplos mecanismos, como: diminuição da permeabilidade da membrana externa por perda ou alterações na estrutura de porinas; atividade de bombas de efluxo, que promovem a diminuição da concentração do antimicrobiano no interior da bactéria; e/ou por ação de diversas enzimas que hidrolisam a maioria dos agentes β -lactâmicos, como as cefalosporinas, penicilinas e, principalmente, os carbapenêmicos, por isto conhecida como carbapenemase (LIVERMORE, 2002; PEREZ *et al.*, 2007). Diversas beta-lactamases adquiridas pertencentes à classe B de Ambler e conhecidas como metalo-beta-lactamases (MBL), ou a classe D, também conhecidas como oxacilinases, têm sido identificadas nestes microrganismos (AMBLER, 1980; BUSH *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

As MBLs necessitam de dois íons divalentes, usualmente zinco (Zn^{++}), como cofator para a reação de hidrólise do anel beta-lactâmico, podendo ser detectadas por meio de testes fenotípicos, com o auxílio de um agente quelante, como os ácidos etilenodiaminotetracético (EDTA) e 2-mercaptopropiônico (MPA), entre outros (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

Até o momento, não há métodos de detecção fenotípica de MBL padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Contudo, devido ao aumento no número de amostras produtoras de MBL, diferentes testes fenotípicos têm sido publicados na literatura e utilizados pelos laboratórios clínicos no rastreamento de amostras produtoras de MBL nos hospitais brasileiros (MENDES *et al.*, 2006).

5.3.1 Pesquisa de β -lactamases da classe B (MBL)

5.3.1.1 Método de disco-aproximação (DA)

Doze (30%) amostras de *P. aeruginosa* e 24 (37,5%) de *A. baumannii* apresentaram sinergismo com, pelo menos, uma das combinações de substrato-inibidor e foram consideradas produtoras de MBL por este método. As combinações CAZ + MPA, CAZ + MAA e CAZ + EDTA foram positivas em 27,5% das amostras de *P. aeruginosa* (11/40) e as outras combinações em apenas 2,5% Tabela 6. Nas amostras de *A. baumannii*, verificou-se maiores índices de produção

nas combinações IMI+EDTA e IMI+MPA, resultados positivos em 14% (9/64) e 25% (16/64), respectivamente Tabela 7

TABELA 6

Frequência das combinações substrato-inibidor pelo método de disco-aproximação para detecção fenotípica de metalo- β -lactamases nas amostras de *P. aeruginosa* (n=40).

Antimicrobianos +	Nº de amostras positivas	%
Inibidores		
IMI + MPA	1	2,5
IMI + MAA	1	2,5
IMI + EDTA	1	2,5
CAZ + MPA	11	27,5
CAZ + MAA	11	27,5
CAZ + EDTA	11	27,5

MPA: ácido 2-mecaptopropiônico, MAA: ácido 2-mercaptoacético, EDTA: ácido etilenodiaminotetracético, CAZ: Ceftazidima, IMP: imipenem.

TABELA 7

Frequência das combinações substrato-inibidor utilizadas pelo método de disco-aproximação para detecção fenotípica de metalo- β -lactamases nas amostras de *A. baumannii* (n=64).

Antimicrobianos +	Nº de amostras positivas	%
Inibidores		
IMI + MPA	9	14
IMI + MAA	6	9,3
IMI + EDTA	16	25
CAZ + MPA	6	9,3
CAZ + MAA	5	7,8
CAZ + EDTA	5	7,8

MPA: ácido 2-mecaptopropiônico, MAA: ácido 2-mercaptoacético, EDTA: ácido etilenodiaminotetracético, CAZ: Ceftazidima, IMP: imipenem.

O Gráfico 4 mostra a distribuição das amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* positivas para MBL pelo método disco-aproximação por hospital participante, e a Figura 5 exemplifica uma amostra positiva pelo método de DA. Os resultados individuais de todas as amostras testadas por DA e positividade das combinações substrato-inibidor estão detalhados no Anexo B.

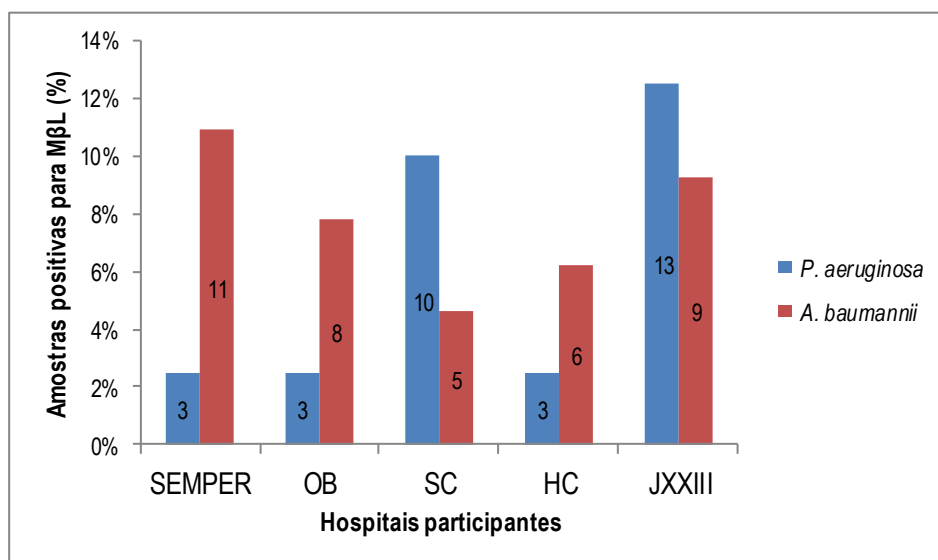


Gráfico 4. Distribuição das amostras positivas para MBL pelo método do DA por hospitais participantes nas amostras de *P. aeruginosa* (n=40) e *A. baumannii* (n=64) analisadas. SEMPER: Hospital Semper; OB: Hospital Odilon Behrens; SC: Santa Casa; HC: Hospital das Clínicas; JXXIII: Hospital João XXIII

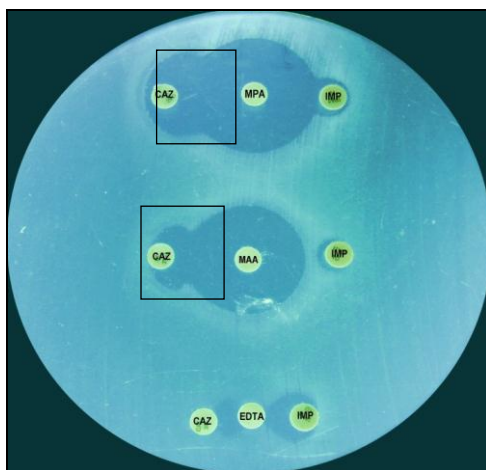


Figura 5 - Teste positivo pelo método de disco-aproximação. Observa-se distorção e ampliação do halo de inibição de crescimento da bactéria testada.

O método de DA é simples, de baixo custo e pode ser incorporado facilmente à rotina de um laboratório de Microbiologia. Este teste é fortemente influenciado pela concentração dos

inibidores de MBL utilizados, que podem possuir seus próprios efeitos bactericidas, resultando em zonas de inibição expandidas, não associadas com a verdadeira produção de MBL (PICÃO *et al.*, 2008).

Estudo realizado em São Paulo, avaliando 69 amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem por disco-aproximação (DA), mostrou que 53 (76,8%) destas apresentaram sinergismo com pelo menos uma das combinações de substrato-inibidor e foram consideradas positivas. A combinação IMP-EDTA foi positiva em 98,1% das amostras (52/53) e a combinação IMP-MPA foi positiva em 13,2% (7/53) daquelas positivas por DA (Franco *et al.*, 2010). Nossos resultados não corroboraram esse estudo, pois obtivemos valores abaixo com este método: observou-se que 30% (12/40) das amostras de *P. aeruginosa* e 37,5% (24/64) de *A. baumannii* apresentaram sinergismo com, pelo menos, uma das combinações de substrato-inibidor. As combinações com maior positividade foram CAZ+MPA, CAZ+MAA, CAZ+EDTA, todas positivas em 27,5% das amostras de *P. aeruginosa*, e IMI+EDTA em 14% e IMI+MPA em 25% das amostras de *A. baumannii* (Tabelas 6 e 7; Anexos C e Ca).

A interpretação dos resultados do teste de sinergismo é subjetiva, pois se dá pela observação do aumento na área de inibição entre os discos. GALLEGO e colaboradores também relatam em seu estudo com amostras de *A. baumannii* que, em alguns casos, houve dificuldade na interpretação dos resultados do teste com EDTA, e não pode ser valorizado de forma conveniente. A mesma dificuldade ocorreu durante o nosso experimento, uma vez que, por dificuldades de interpretação, muitos dos testes foram considerados negativos. Variações na preparação dos discos ou a distância entre os discos na placa afetavam, de forma importante, o resultado. A solução de EDTA também pode interferir no crescimento bacteriano e isto alteraria o resultado (GALLEGO *et al.*, 2004).

5.3.1.2 Epsilometer test (Etest MBL)

Doze (30%) amostras de *P. aeruginosa* e 60 (63,75%) de *A. baumannii* foram positivas para a produção de MBL pelo método do Etest. A porcentagem de amostras positivas variou de 12,5% a 29,6%, de acordo com cada hospital (GRAF. 5). Os resultados individuais das amostras testadas pelo Etest, de acordo com as instituições participantes, encontram-se no Anexo B. As figuras 6, 7 e 8 exemplificam, respectivamente, duas amostras positivas para MBL e uma negativa pelo método de ETest.

Os resultados referentes aos testes fenotípicos de MBL (Disco-aproximação, Etest e THM) das amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* de acordo com as instituições participantes encontram-se nos Anexos B e Bb.

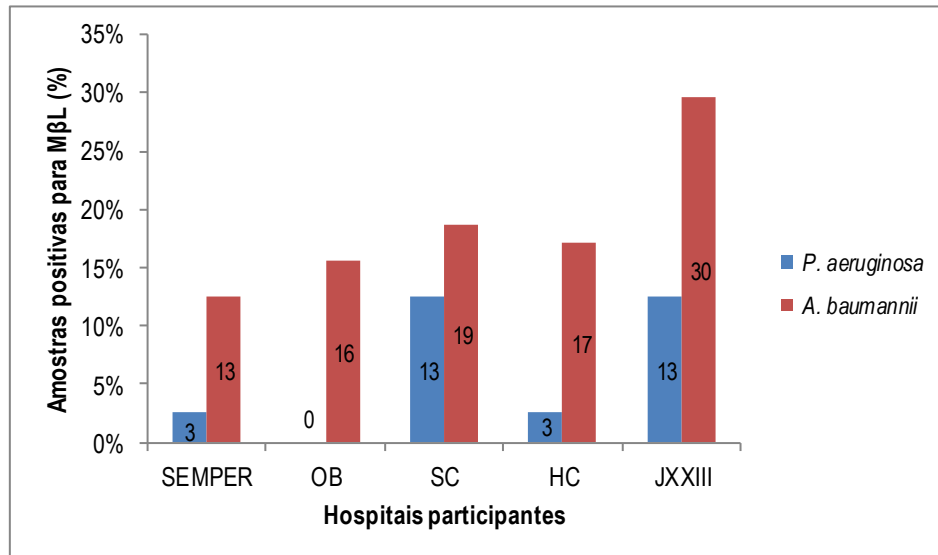


GRÁFICO 5. Distribuição das amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* positivas para MBL pelo método do E-test de acordo com os hospitais participantes. SEMPER: Hospital Semper; OB: Hospital Odilon Behrens; SC: Santa Casa; HC: Hospital das Clínicas; JXXIII: Hospital João XXII. Amostras testadas: *P. aeruginosa* (n=40) e *A. baumannii* (n=64)

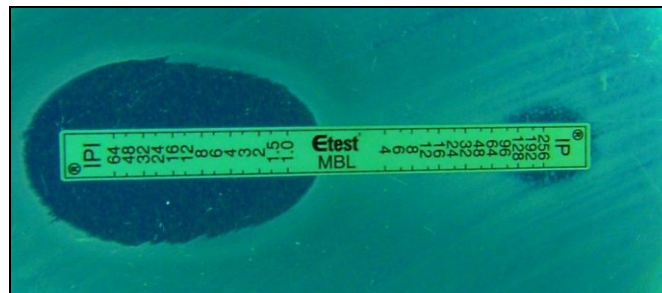


FIGURA 6. Etest MBL positivo: relação da CIM de IP/IPi ≥ 8 (*P. aeruginosa*)

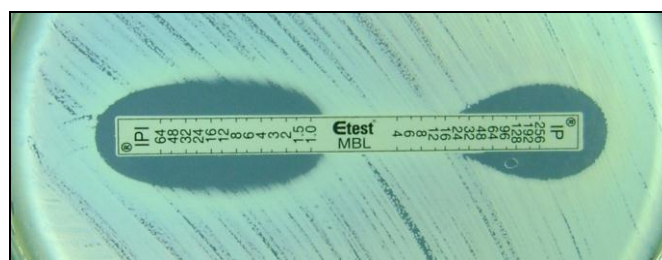


FIGURA 7. Etest MBL positivo: relação da CIM de IP/IPi ≥ 8 (*A. baumannii*)

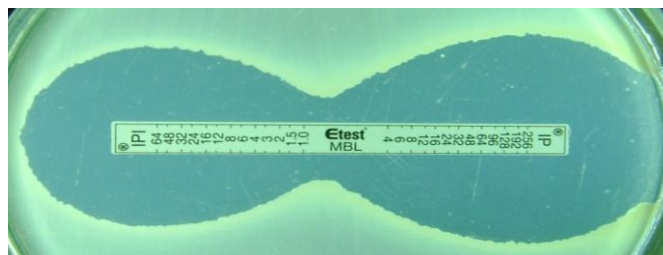


FIGURA 8. Etest MBL Negativo: não demonstrou relação da CIM de IP/IPI ≥ 8

Os resultados do Etest foram positivos também em 12 (30%) amostras de *P. aeruginosa* enquanto que o número de amostras positivas em *A. baumannii* foi bem maior 60 (95,3 %) mostrando-se mais eficiente dos testes na presente pesquisa de MBL . Estudo realizado em São Paulo, citado anteriormente, avaliando 69 amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem por DA mostrou valores mais elevados em relação aos nossos resultados, que 53 (76,8%) amostras foram positivas pelo método de Etest®MBL (FRANCO *et al.*, 2010).

O método do Etest®MBL é baseado no princípio da difusão em ágar, sendo o imipenem incorporado em uma das extremidades da tira e imipenem associado ao EDTA na outra. Apesar de fácil execução, apresenta custo elevado e é exclusivo para amostras resistentes ao imipenem (YAN *et al.*, 2004).

5.3.1.3 Teste de Hodge Modificado (THM)

Apenas quatro amostras de *P. aeruginosa* (10 %) foram positivas pelo teste de THM e, todas as amostras de *A. baumannii* foram negativas. Os resultados individuais das amostras testadas pelo THM, de acordo com as instituições participantes, encontram-se no Anexo B.

O teste de Hodge Modificado (THM) é utilizado para *screening* da atividade de carbapenemases, não especificamente das enzimas do tipo MBL, sendo que outras enzimas, como as oxacilinases e as do grupo A de Ambler, são, também, passíveis de detecção pelo mesmo (LEE *et al.*, 2003).

Estudo realizado em São Paulo, citado anteriormente, avaliando 69 amostras de *P. aeruginosa* resistentes, mostrou 19 (27,5%) amostras positivas pelo THM (FRANCO *et al.*,

2010). Nossos resultados mostraram apenas quatro amostras de *P. aeruginosa* (10 %) positivas.

Falsos negativos pelo THM têm sido descritos e alguns autores sugerem que a adição de 10 µM de solução de sulfato de zinco a 50 mM ao disco de imipenem, ou a utilização de ágar Muller Hinton com sulfato de zinco numa concentração final de 70 µg/mL, pode minimizar este problema (LEE *et al.*, 2003; GIRLICH *et al.*, 2011).

5.3.2 Pesquisa de β-lactamases da classe D (Oxacilinases/Oxacarbapenemase) e classe C (Cefalosporinase)

Trinta e nove amostras de *A. baumannii* (60,9%) foram positivas para a pesquisa fenotípica de enzimas da classe D pelo método de aproximação de disco, enquanto todas as amostras de *P. aeruginosa* foram negativas.

Na pesquisa de cefalosporinase (AmpC), 51 (79,6%) amostras de *A. baumannii* e 15 (37,5%) de *P. aeruginosa* foram positivas de acordo com o método de disco aproximação. A distribuição dessas enzimas entre as instituições participantes é apresentada na Tabela 8 e detalhada no Anexo B. As Figuras 9 e 10 exemplificam, respectivamente, duas amostras positivas para pesquisa de cefalosporinase e oxacilinase, realizadas na mesma placa, pelo método de aproximação de disco.

TABELA 8
Frequência (%) de amostras de *Acinetobacter baumannii* (n=40) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=64) positivas na pesquisa de enzimas Cefalosporinase e Oxacilinases por hospitais participantes

Hospitais	<i>A. baumannii</i> n=64		<i>P. aeruginosa</i> n=40	
	Cefalosporinase	Oxacilinases	Cefalosporinase	Oxacilinases
SP	6,25	12,5	2,5	0
OB	18,75	14,06	2,5	0
SC	12,5	12,5	10	0
HC	15,6	9,37	2,5	0
JXXIII	26,5	12,5	17,5	0
Total	79,68	60,9	37,5	0

SP: Hospital Semper; OB: Hospital Odilon Behrens; SC: Santa Casa; HC: Hospital das Clínicas; JXXIII: Hospital João XXIII

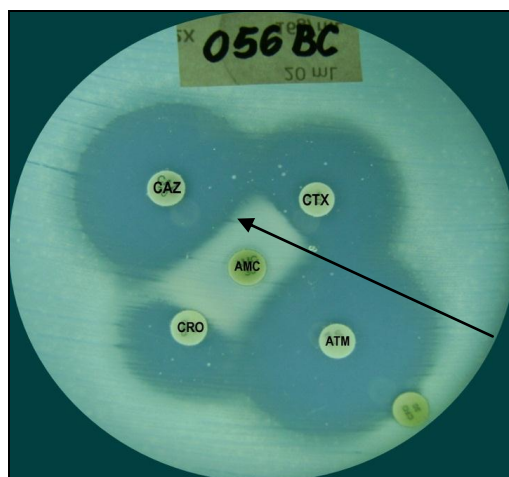


FIGURA 9. Amostra de *A. baumannii* produtora de β -lactamases (classe C) pelo método de disco aproximação. O aparecimento de uma zona de entroncamento “Truncada” para os antimicrobianos CAZ: ceftazidima, CRO: ceftriaxona e CTX: cefotaxima . O disco de cefoxitina (CFO) foi utilizado na mesma placa como indutor de cefalosporinase.

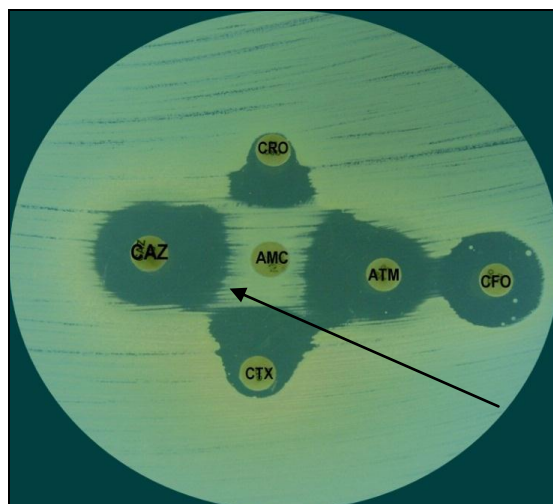


FIGURA 10. Amostra de *P. aeruginosa* produtora de β -lactamases (classe D) pelo método de disco aproximação . O aparecimento de uma zona fantasma “Ghost Zone” para os antimicrobianos CAZ: ceftazidima, CRO: ceftriaxona e CTX: cefotaxima, ATM: Aztreonam . O disco de cefoxitina (CFO) foi utilizado na mesma placa como indutor de cefalosporinase.

5.4 DETECÇÃO GENOTÍPICA DE β -LACTAMASES

5.4.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Dentre as 40 amostras de *P. aeruginosa*, 35 (87,5%) apresentaram produto de PCR compatível com fragmento do gene *bla*_{SPM-1} e *bla*_{VIM-1}, 35 (87,5%) dos produtos amplificados foram compatíveis ao *bla*_{SPM-1}, e 6 (15%) com o gene *bla*_{VIM-1} (GRAF.6). A ocorrência simultânea dos genes, *bla*_{SPM-1}/*bla*_{VIM-1}, foi observada em 6 (15%) amostras de *P. aeruginosa*. Os genes

*bla*_{IMP-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24} e *bla*_{OXA58}, *bla*_{AmpC} não foram identificados em nenhuma das amostras de *P. aeruginosa* avaliadas.

Todas as amostras de *A. baumannii* (64/64) foram positivas para, pelo menos, um dos genes avaliados. Cinquenta e nove amostras (92,1%) apresentaram produto de PCR compatível com fragmento do gene *bla*_{VIM-1}, 51 (79,6%) do gene *bla*_{AmpC}, 60 (93,75%) ao gene *bla*_{OXA23} e 54 (84,3%) do gene *bla*_{OXA51} (GRAF. 6 e 7). Os genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA24} e *bla*_{OXA58} não foram identificados em nenhuma das amostras de *A. baumannii* avaliadas.

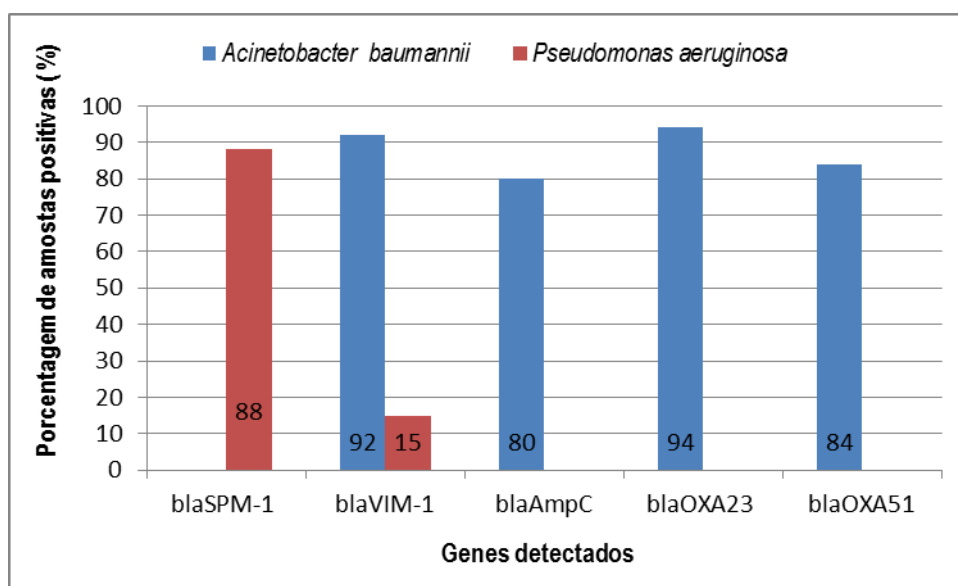


GRÁFICO 6 - Porcentagem de amostras de *Acinetobacter baumannii* (n=64) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=40) carreadoras de genes que codificam β-lactamases (MβL, cefalosporinase e oxacilinas).

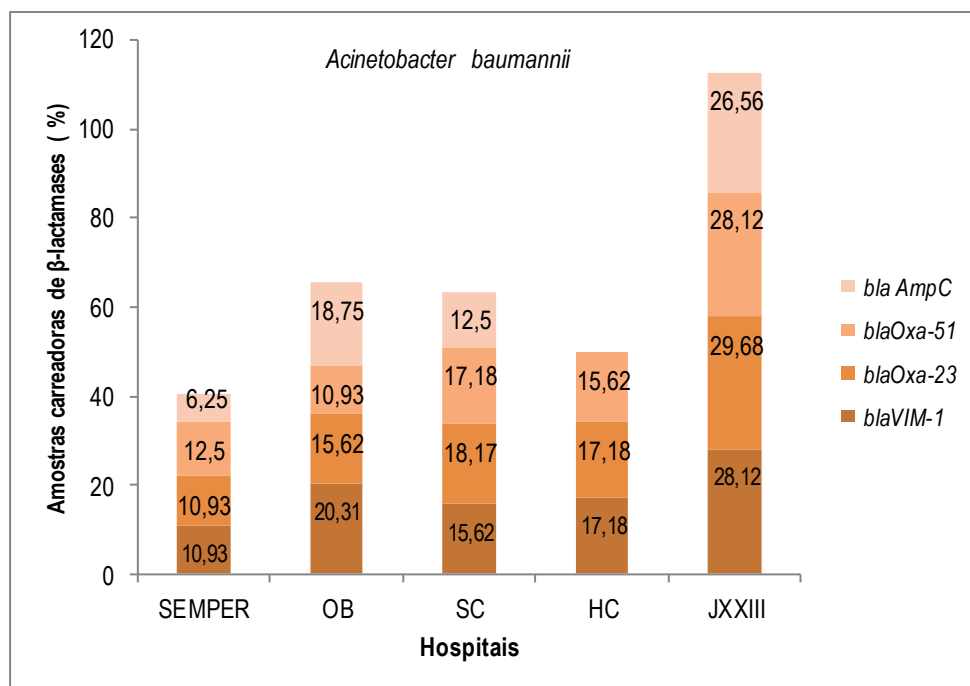


GRÁFICO 7 – Porcentagens de amostras de *A. baumannii* (n=60) carreadoras de genes que codificam MBL, oxacilinases e cefalosporinase por hospitais.

A Tabela 13 mostra os dados referentes a frequência da combinação de genes carreadores de betalactamases em amostras de *A. baumannii*, sendo *bla*_{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51, a mais frequente.}

TABELA 9

Frequência da combinação de genes carreados por amostras de *Acinetobacter baumannii* avaliadas (n=64)

Genes	Frequência	%
<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}	37	57,8 %
<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23}	6	9,3%
<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa51}	1	1,5%
<i>bla</i> _{AmpC/Oxa23/Oxa51}	3	4,6%
<i>bla</i> _{VIM-1/Oxa23/Oxa51}	10	15,6%
<i>bla</i> _{VIM-1/Oxa51}	1	1,5%
<i>bla</i> _{Oxa23/Oxa51}	2	3,1%
<i>bla</i> _{AmpC/Oxa23}	1	1,5%
<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC}	3	4,6%

A reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction-PCR*) é uma técnica de referência para detecção dos diferentes genes que codificam as β -lactamases (WALSH *et al.*, 2005; 2010). Pela técnica, vários genes de MBL em *P. aeruginosa* têm sido detectados nas diferentes regiões do Brasil. Estudo em Uberlândia detectou o gene *bla*_{SPM-1} em 33% (n=3/15) das amostras (CEZÁRIO *et al.*, 2009); em Passo Fundo (RS), o mesmo em 77,6% (n= 173/223) (MACHADO *et al.*, 2011); em São Paulo, FURTADO *et al.* (2011) detectaram o gene *bla*_{SPM-1} em 17,2% (n=5/25) e FRANCO *et al.* (2010) relataram *bla*_{SPM-1} em 81% e *bla*_{VIM-2} em 19%.

Em nosso estudo, a detecção genotípica de β -lactamases mostrou que 87,5% (35/40) das amostras de *P. aeruginosa* apresentaram o gene *bla*_{SPM-1} e 15% (6/40) o gene *bla*_{VIM-1} (Gráfico 6; anexos D e Da). Todas as amostras oriundas do Hospital JXXIII (17/17) apresentaram o gene *bla*_{SPM-1}. A ocorrência simultânea dos genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{VIM-1} foi observada em seis (15%) amostras de *P. aeruginosa*, sendo três delas no Hospital João XXIII, duas na Santa Casa de Misericórdia, e uma no Hospital Odilon Behrens.

Nossos resultados mostraram que as amostras de *A. baumannii* foram positivas para, pelo menos, um dos genes pesquisados. O gene *bla*_{VIM-1} foi identificado em 92,1% (59/64) das amostras; *bla*_{AmpC} em 79,6% (51/64); *bla*_{OXA23} em 93,75% (60/64) e, *bla*_{OXA51} em 84,3% (54/64). Estes genes foram identificados em amostras dos cinco hospitais participantes. A ocorrência simultânea dos genes, *bla*_{VIM-1} *bla*_{AmpC}, *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA51} foi a mais frequente (37 linhagens), sendo 77% delas de amostras oriundas de UTI/CTI/UTQ (TAB. 13; ANEXOS Ea).

O gene *bla*_{SPM-1} é o mais frequente no Brasil (QUEENAN & BUSH, 2007; WALSH 2010; CORNAGLIA *et al.*, 2011), e nossos resultados concordaram com os trabalhos descritos na literatura. O gene foi detectado em 88% das amostras. A enzima SPM foi à terceira enzima MBL a ser descoberta em amostras de *P. aeruginosa* em São Paulo, Brasil (TOLEMAN *et al.*, 2002). Até agora, esta enzima encontra-se limitada apenas ao território brasileiro, embora já tenha sido relatado na Suíça o isolamento de uma amostra de *P. aeruginosa* em paciente que havia recebido atendimento primário na cidade do Recife, PE (SALABI *et al.*, 2010). No entanto, a detecção do gene *bla*_{VIM-1} vem crescendo, já tendo sido encontrado em vários países (WALSH 2010; CORNAGLIA *et al.*, 2011).

Em Goiânia, foram avaliadas 62 amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e à ceftazidima. Destas, 35 (56,4%) mostraram-se fenotipicamente produtoras de metalo-beta-lactamases. O 2-mercaptopropiônico foi o inibidor que apresentou melhor atividade em relação ao EDTA na detecção das amostras produtoras. O gene *bla*_{SPM-1} foi detectado em 26 (74,3%)

das 35 amostras de *P. aeruginosa* que apresentaram fenótipo positivo. Os genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2} não foram detectados (GONCALVES *et al.*, 2009).

Estudo realizado na Tunísia avaliando um surto nosocomial de *P. aeruginosa* imipenem-resistente produzindo VIM-2 metalo- β -lactamase em uma unidade de transplante de rim mostrou que 16 amostras (67%) foram positivas para esta enzima, de acordo com o teste de sinergia imipenem-EDTA, sugerindo a presença de MBLs nas amostras. Contudo, chegaram à conclusão de que a aquisição de um gene MBL, por si só, não necessariamente confere elevado nível de resistência aos carbapenêmicos, devendo estar associados outros mecanismos de resistência (HAMMAMI *et al.*, 2011).

Carbapenemases pertencentes à classe molecular D emergem em *A. baumannii* em todo o mundo e estas enzimas hidrolizam as oxacilinas, oximino-cefalosporinas e cabanêpemicos. A eficiência hidrolítica das oxacilinas contra carbapenêmicos é muito menor que a das MBLs, não hidrolisando cefalosporinas de espectro estendido e aztreonam. Sua atividade é inibida por ácido clavulânico, uma propriedade comum das oxacilinas, exceto pela enzima OXA-23, que é resistente ao ácido clavulânico. Embora tenham sido descritas em outros bacilos Gram negativos, estas ocorrem predominantemente em *P.aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (BUSH-JACOBY, 2010). No presente estudo, foram encontradas somente em amostras de *A. baumannii*: 60 (93,75%) com o gene *bla*_{OXA23} e 54 (84,3%) com o gene *bla*_{OXA51}. Os genes *bla*_{OXA24} e *bla*_{OXA58} não foram identificados em nenhuma das amostras de *A. baumannii* avaliadas.

No Brasil, *A. baumannii* produtor de OXA-23 foi detectado pela primeira vez em 2003, em Curitiba, uma cidade da Região Sul, e rapidamente se espalhou para estados vizinhos. Desde então, tem-se notado uma incidência crescente de infecções causadas por *A.baumannii* resistente a carbapenêmicos.

Estudo realizado em São Paulo avaliando infecção da corrente sanguínea por *A. baumannii* em um Hospital Universitário mostrou que, das 29 linhagens resistentes a carbapenêmicos identificadas em uma UTI, 21 (72,4%) delas foram positivas para a enzima OXA-23 (FURTADO *et al* 2011). Nossos estudos apresentaram uma taxa maior, com 60 (93,75%). Já em Porto Alegre, em amostras de *A. baumannii* multirresistentes, foi observada a presença do gene *bla*_{oxa23} em 99 %. Os genes *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA58} não foram identificados (MARTINS *et al.*, 2011).

As ESBL tipo OXA de *Acinetobacter* spp. são divididas em quatro subgrupos filogenéticos: OXA-23; OXA-24; OXA-51 e OXA-58. Há alguns anos, foi sugerido que as enzimas pertencentes ao subgrupo do tipo OXA-51 seriam intrínsecas em *A. baumannii*, ocorrendo na maioria ou em todas as linhagens (WOODFORD *et al.*, 2006). No atual estudo, 84,3% das amostras avaliadas apresentaram produtos de PCR compatíveis ao fragmento do gene *bla*_{OXA51}, confirmando que essas eram da espécie *A. baumannii*.

Em estudo sobre o primeiro relato do gene *bla*_{OXA-58} em uma amostra clínica de *A. baumannii*, Rio de Janeiro (RJ), a análise por PCR realizada com iniciadores específicos para enzimas da classe D de Ambler detectou os genes *bla*_{oxa-58} e *bla*_{oxa-23} em uma e três amostras, respectivamente. Todas as estirpes foram positivas para o gene *bla*_{oxa-51}, uma característica intrínseca de *A. baumannii* (FIGUEIREDO *et al.*, 2011).

No nosso estudo, 51 (79,6%) das amostras apresentaram o gene *bla*_{AmpC}, e este gene esteve combinado com outros genes β -lactâmicos nos seguintes agrupamentos: *bla*_{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51} (57,81%), *bla*_{VIM-1/AmpC/Oxa23} (9,3%), *bla*_{VIM-1/AmpC/Oxa51} (1,5%) , *bla*_{AmpC/Oxa23/Oxa51} (4,6%) , *bla*_{AmpC/Oxa23} (1,5%) e *bla*_{VIM-1/AmpC} (4,6%), como mostrado na tabela 9.

Acinetobacter spp. têm uma variedade de β -lactamases adquiridas, mas a resistência oximino- β -lactâmicos é vista, cada vez mais, neste agente patogênico oportunista, sendo, muitas vezes, atribuível à sua enzima AmpC. A enzima é, normalmente, expressa em baixos níveis e não é induzível, mas a superexpressão ocorre com a inserção a montante de um elemento de inserção (IS *Aba1*) comum em *A. baumannii* , que fornece um promotor eficaz para o *bla*_{AmpC}. Os plasmídeos que transportam genes para AmpC β -lactamases frequentemente transportam múltiplas outras resistências, incluindo genes de resistência aos aminoglicosídeos, cloranfenicol, quinolonas, tetraciclina, sulfonamidas e trimetoprim, assim como outros genes para as β -lactamases, incluindo TEM-1, PSE-1, M-CTX-3, as variedades SHV, e VIM-1 (JACOBY, 2009).

TABELA 10

Relação entre os resultados obtidos pelos métodos fenotípicos e genotípicos aplicados para a pesquisa de enzimas β -lactamases nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e

Acinetobacter baumannii

<i>P. aeruginosa</i> n= 40	Métodos fenotípicos (%)	Método genotípico (PCR)	Concordância (%)	Discordância (%)
DA	30	87,5	30	70
Etest	30	87,5	30	70
THM	7,5	87,5	7,5	92,5
ESBL	37,5	0	0	100
<i>A.baumannii</i> n=64				
DA	37,5	92,1	37,5	62,5
Etest	63,75	98,43	63,75	36,27
THM	0	0	0	100
ESBL	76,56	93,75	76,56	23,44

Os resultados pelos métodos fenotípicos e genotípicos aplicados às amostras de *P. aeruginosa* mostraram concordância em 30% quanto à produção de MBL para os testes fenotípicos de DA e Etest, e de 7,5% para THM, não se observando concordância de enzimas ESBL com a PCR. Em amostras de *A. baumannii*, 37,5%, 63,75%, 76,56% concordaram nos dois métodos para pesquisa de enzima β -lactamases Tabela 10.

Na detecção fenotípica de MBL, nem o DA nem o Etest corrobora os dados da pesquisa de genes que codificam enzimas MBL, que foram detectados em 88% das amostras. A baixa correlação encontrada em nosso estudo entre os testes fenotípicos e genotípicos para detecção de MBL pode ser explicada pela interferência de inibidores, ou outros mecanismos associados. Aqui, mostrou-se que este alto índice é devido, principalmente, a genes codificadores de ESBL, OXA e MBL, juntamente com outros mecanismos de resistência. O fato de algumas amostras serem carreadoras dessas enzimas acaba por tornar esses antimicrobianos inativos, gerando os altos índices de resistência.

A incoerência entre a presença do gene MBL e a resistência dos carbapenêmicos pode ocasionar dificuldade na interpretação da detecção fenotípica de amostras produtoras de MBL (LIVEMORE, 2000). Embora as MBLs tenham atividade hidrolítica entre os carbapenêmicos, a relação entre a presença do gene MBL e o perfil fenotípico é, frequentemente, imperfeita, sendo relatadas algumas amostras sensíveis aos carbapenêmicos (YAN *et al.*, 2001).

A relação entre o perfil de resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos e a presença dos genes relacionados a esta resistência, nas 35 amostras de *P. aeruginosa* e das 64 amostras de *A. baumannii*, é mostrada nos Gráficos 8 e 9.

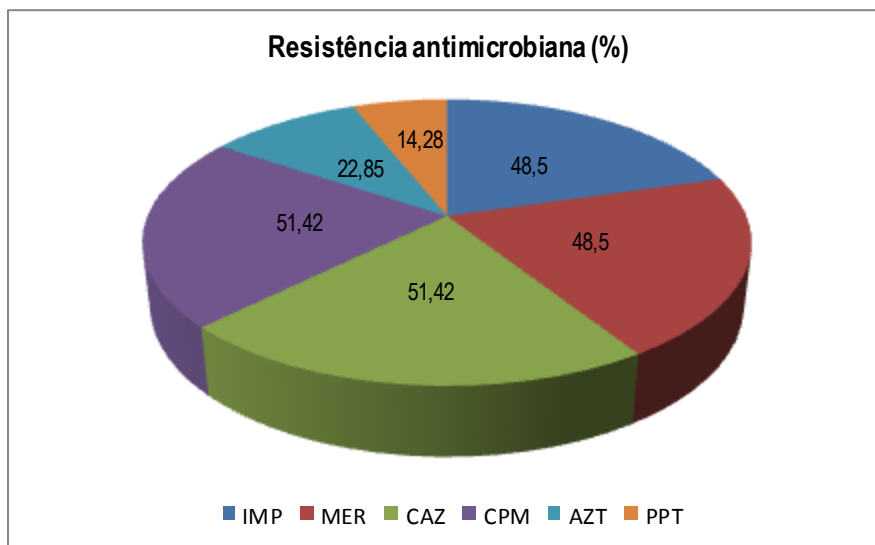


GRÁFICO 8 – Perfil de resistência das 35 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* portadoras dos genes *bla_{SPM-1}* e *bla_{VIM-1}*.

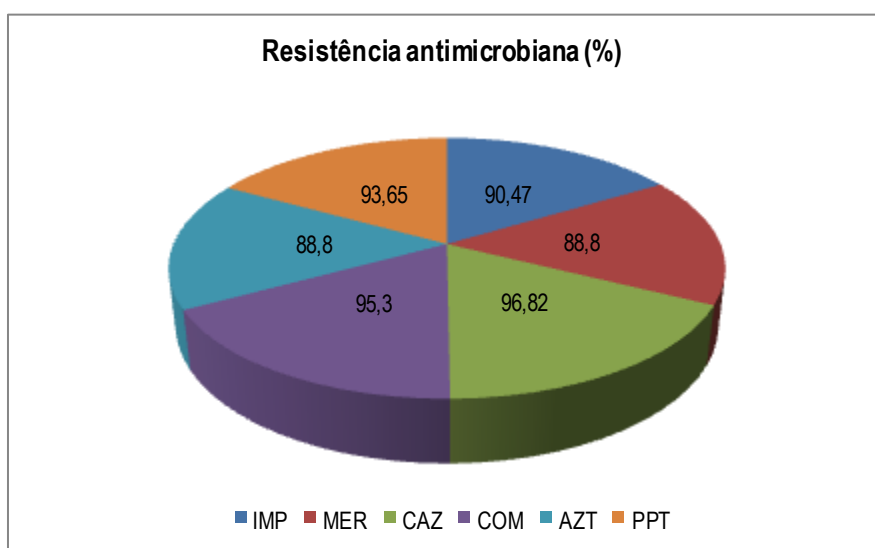


GRÁFICO 9 – Perfil de resistência das 64 amostras de *A. baumannii* portadoras dos genes de β -lactamases *bla_{VIM-1}*, *bla_{AmpC}*, *bla_{OXA23}*, *bla_{OXA51}*

5.4.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

O DNA das 40 amostras de *P. aeruginosa* foi submetido à técnica genotípica por RAPD com os iniciadores CagA2 e CMVin2, obtendo-se, em média, de três a sete fragmentos por amostra, conforme mostrado na tabela do anexo H.

O gráfico 10 mostra o resultado do agrupamento dos perfis de bandas das amostras de *P. aeruginosa* gerados no RAPD. Para a análise de compartilhamento de bandas, foram consideradas as bandas numa faixa aproximada entre 150pb e 1200pb. A matriz do coeficiente de similaridade de DICE gerou um dendrograma obtido por UPGMA, mostrando que as amostras pertencem a três grupos distintos, A, B e C.

Das 40 amostras de DNA amplificadas, 22 (55,5%) foram agrupadas no perfil A, 13 (32,5%) no perfil B e 4 (10%) no perfil C. No perfil A, os fragmentos variaram entre 150 a 700pb; no perfil B, a variação do tamanho molecular dos fragmentos foi de 165 a 330 pb e, no perfil C, de 165 a 1200pb.

A tabela do anexo H que foi utilizada para gerar a matriz utilizada para a construção do dendrograma pelo programa NTSYS, mostra que as amostras MG01 (controle positivo), MG13 e MG14 oriundas de paciente que esteve internado no CTI do Hospital Semper, paciente externo do hospital OB e outro paciente do CTI, respectivamente, foram idênticas com fragmentos de 150, 165, 195, 280 e 330. Esse fato pode ser constatado no primeiro ramo do dendrograma. Assim, é possível visualizar os agrupamentos genotípicos mostrados no dendrograma pela utilização da tabela no anexo H. A tabela 15 mostra o resultado da análise molecular por RAPD das 40 amostras de *P. aeruginosa* produtoras de MBL e seus respectivos setores de origem.

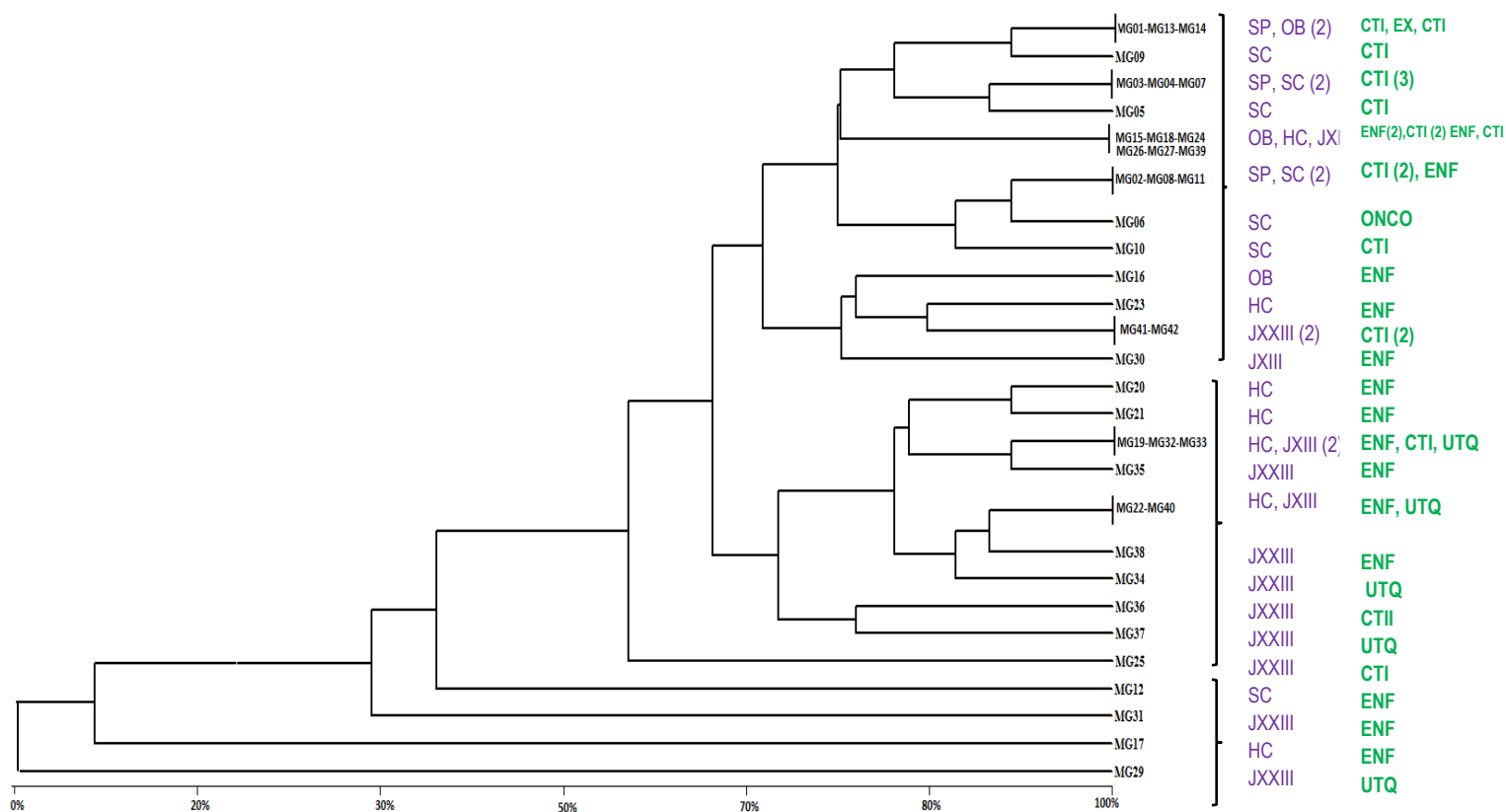


GRÁFICO 10: Dendrograma de similaridade genética derivado do coeficiente de similaridade DICE mostrando as relações entre as amostras de *P. aeruginosa*. Construção feita usando o agrupamento com *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA)

TABELA 11

Resultado da análise molecular por RAPD das 40 de amostras de *P. aeruginosa* portadoras dos genes de MBL e seus respectivos setores

	Hospital	SETOR	Perfil	Gene
1	SEMPER	CTI	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
2		CTI	A	-
3		CTI	A	-
4	SC	CTI	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
5		CTI	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
6		ONCO	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
7		CTI	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
8		CTI	A	<i>bla</i> _{SPM-1/VIM-1}
9		CTI	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
10		CTI	A	<i>bla</i> _{SPM-1/VIM-1}
11		ENF	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
12		ENF	C	<i>bla</i> _{SPM-1}
13	OB	EXT	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
14		CTI	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
15		ENF	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
16		ENF	A	<i>bla</i> _{SPM-1/VIM-1}
17	HC	ENF	C	<i>bla</i> _{SPM-1}
18		ENF	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
19		ENF	B	<i>bla</i> _{SPM-1}
20		ENF	B	-
21		ENF	B	-
22		ENF	B	<i>bla</i> _{SPM-1}
23		ENF	A	-
24	JXXIII	CTI	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
25		CTI	B	<i>bla</i> _{SPM-1}
26		CTI	A	<i>bla</i> _{SPM-1/VIM-1}
27		ENF	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
28		UTQ	B	<i>bla</i> _{SPM-1}
29		UTQ	C	<i>bla</i> _{SPM-1/VIM-1}
30		ENF	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
31		ENF	C	<i>bla</i> _{SPM-1}
32		CTI	B	<i>bla</i> _{SPM-1}
33		UTQ	B	<i>bla</i> _{SPM-1}
34		CTI	B	<i>bla</i> _{SPM-1/VIM-1}
35		ENF	B	<i>bla</i> _{SPM-1}
36		CTI	B	<i>bla</i> _{SPM-1}
37		UTQ	B	<i>bla</i> _{SPM-1}
38		ENF	B	<i>bla</i> _{SPM-1}
39		CTI	A	<i>bla</i> _{SPM-1}
40		UTQ	A	<i>bla</i> _{SPM-1}

A tipagem molecular é uma metodologia que auxilia na identificação dos diferentes perfis clonais de microrganismos que carregam genes de resistência aos antimicrobianos usados na prática clínica hospitalar. O conhecimento da distribuição geográfica desses microrganismos pode levar a um melhor entendimento da disseminação da resistência bacteriana e favorecer seu controle.

A técnica de RAPD, também conhecida como PCR com iniciador arbitrário (AP-PCR) compara o perfil de fragmentos de DNA amplificados de forma aleatória no genoma do organismo e, portanto, pode favorecer estudos de variabilidade genética de inúmeros organismos, incluindo bactérias.

No presente estudo, empregando-se o RAPD no estudo das 40 amostras de *P. aeruginosa*, foi possível identificar três diferentes perfis genéticos: o perfil A, com 24 (60%) amostras; o perfil B, com 13 (32,5 %) amostras e o perfil C, com quatro (10 %).

Foi observada, no perfil A, a ocorrência de amostras dos cinco hospitais participantes, sendo 13 (54,2%) provenientes dos CTIs, sete (29,2%) das enfermarias, uma do setor de oncologia e uma de paciente externo. O tamanho dos fragmentos variou entre 150 a 700 pb. O gene *bla_{SPM-1}* foi o predominante nestas amostras, estando presente em 87,5 % (21/24) delas, e a combinação *bla_{SPM-1}/bla_{vim-1}* em 8,3% (2/24). A metade das amostras foi resistente aos carbapenêmicos e 11/40 (27,5%) foram produtoras de enzimas de MBL em, pelo menos, um dos testes fenotípicos empregados.

De acordo com os dados gerados pelas análises de similaridade, as amostras MG1, provenientes do CTI do Hospital Semper (HS), e duas (MG13 e MG14), do CTI do Hospital Odilon Behrens (HOB), apresentaram o mesmo perfil de bandas (fragmentos de 150, 165, 195, 280 e 330 pb), com similaridade de, aproximadamente, 85 %. A mesma similaridade foi observada para as amostras MG2 do HS, MG8 e MG11 da Santa Casa (fragmentos de 165, 195, 280, 330 e 450 pb). É possível sugerir que exista uma população clonal de linhagens carreadoras dos mesmos genes de resistência nestas instituições. Vale ressaltar que todas estas amostras carregavam o gene *bla_{SPM-1}* e que a amostra MG8 carregava simultaneamente os genes *bla_{SPM-1}/bla_{vim1}*.

No perfil B, estão incluídas amostras de apenas dois hospitais (HC e HJXXIII), sendo, sua maioria, oriunda das enfermarias (46% - 6/13), seguida da UTQ (30,7%; 4/13) e do CTI (23%;3/13). No perfil C, observou-se a presença de amostras de três hospitais; porém, com baixa similaridade entre elas.

5.4.3 *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)*

Para análise genotípica do DNA com iniciadores ERIC foram incluídas no estudo apenas amostras com gene de resistência *bla_{SPM-1}* (*P. aeruginosa*, 35 amostras) e gene *bla_{Oxa23}* e *bla_{OXA51}* (*A. baumannii*, 56 amostras).

A análise genotípica das 35 amostras de *P. aeruginosa* e das 56 de *A. baumannii* foi empregado à técnica ERIC-PCR produziu, em média, sete a 10 fragmentos para amostra de *P. aeruginosa* e de três a 12 para amostras de *A. baumannii*. As tabelas no anexo Ha, utilizadas para gerar a matriz para a construção dos dendrogramas pelo programa NTSYS, mostram o tamanho molecular dos fragmentos obtidos por ERIC-PCR.

Os gráficos 11 e 12 mostram o resultado do agrupamento dos perfis de bandas das amostras gerados no ERIC-PCR. Para a análise de compartilhamento de bandas, foram consideradas as bandas numa faixa aproximada entre 100pb a 1200pb para as amostras de *P. aeruginosa* e de 70pb a 1500pb para as amostras *A. baumannii*. A matriz do coeficiente de similaridade de DICE gerou dendrogramas obtidos por UPGMA, mostrando a relação clonal entre as espécies. No GRAF.11, estão representados os agrupamentos das 35 amostras de *P. aeruginosa* e no GRAF. 12, os agrupamentos de 56 amostras de *A. baumannii* obtidas dos diferentes hospitais, é possível inferir que existem perfis heterogêneos de linhagens circulantes em cada hospital analisado. No caso de *P. aeruginosa* (GRAF.11) é possível verificar que a maioria das amostras diferiu entre si. Com relação às amostras 01 (Hospital Semper) e 04 (Hospital Santa Casa), ambas oriundas do CTI, estas apresentaram o mesmo perfil de bandas entre si e com a amostra controle positivo, sendo possível sugerir que existe uma população clonal de cepas que estão carreando os mesmos genes de resistência (*bla_{SPM-1}*).

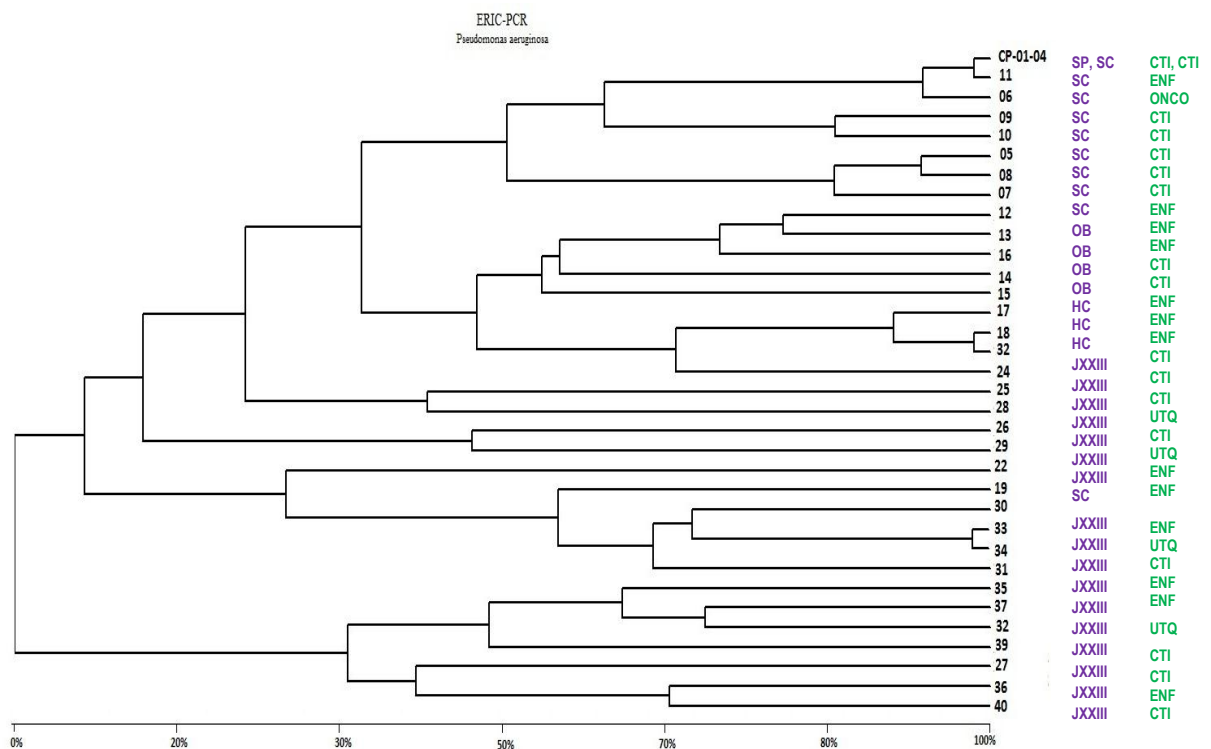


GRAFICO 11: Dendrograma de similaridade genética derivado do coeficiente de similaridade DICE implementado pelo programa NTSYS, mostrando as relações entre as amostras de *P. aeruginosa* analisadas (n= 35). Construção feita usando o agrupamento com *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA)

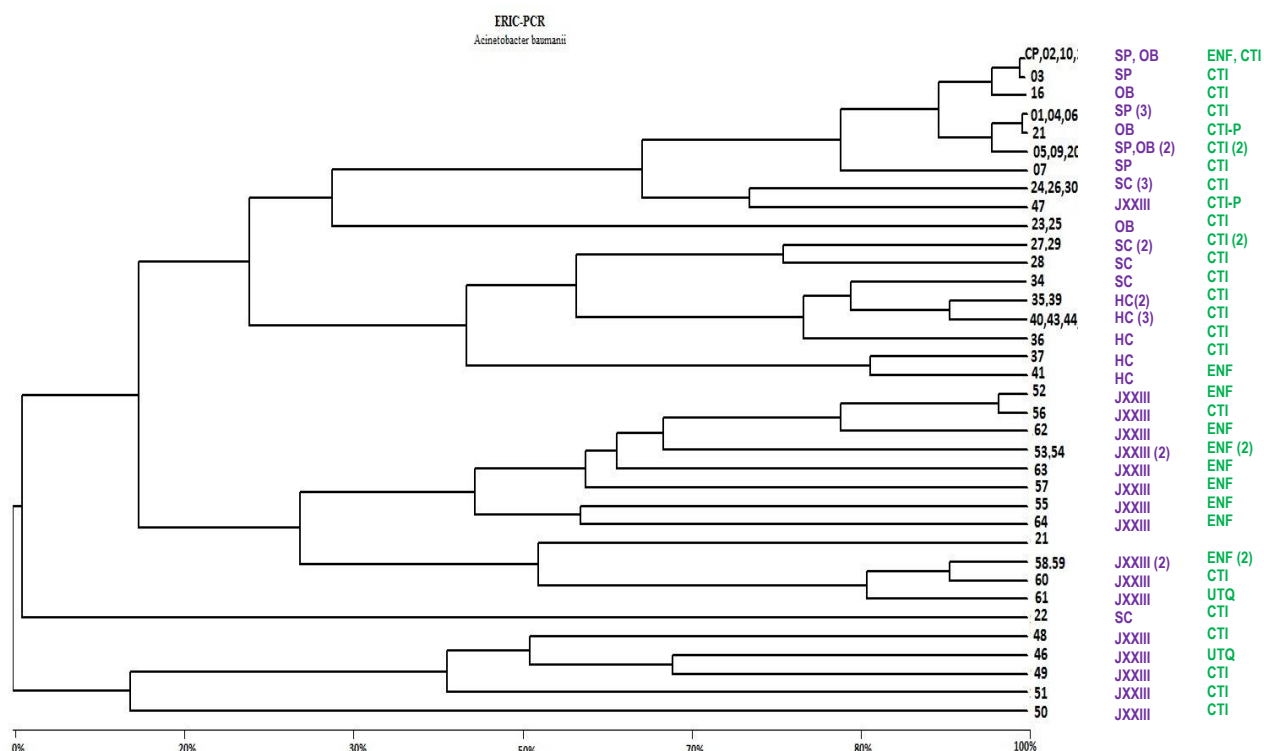


GRAFICO 12: Dendrograma de similaridade genética derivado do coeficiente de similaridade DICE implementado pelo programa NTSYS mostrando as relações entre as amostras de *Acinetobacter baumannii* analisadas (n=56). Construção feita usando o agrupamento com Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).

A genotipagem pelo ERIC-PCR se baseia na análise de sequências cromossômicas repetidas, sendo usada para a caracterização clonal de diferentes espécies e estudo da relação genética entre amostras, mostrando boa capacidade discriminatória (COSTA *et al.*, 2006; MAURER *et al.*, 1998).

No nosso estudo, empregando-se a técnica de ERIC-PCR na análise das 35 amostras de *P. aeruginosa* carreadoras dos genes *bla*_{SPM-1} e *bla*_{vim1}, foi possível observar um variado grau de similaridade entre as amostras, de 45 a 100%, sendo predominante um perfil mais heterogêneo. As amostras de números 01 e 04, ambas oriundas de CTIs (do Hospital Semper e Santa Casa, respectivamente); as de números 18 e 32, provenientes de enfermarias do Hospital das Clínicas, e as de números 33 e 34 (de enfermaria e UTQ do Hospital João XXIII), apresentaram similaridade de, aproximadamente, 98%, sugerindo, também, a existência de uma população clonal de linhagens carreadoras dos mesmos genes de resistência, uma vez que todas elas apresentavam o gene *bla*_{SPM-1}.

O resultado da análise das 56 amostras de *Acinetobacter* spp. utilizando o ERIC-PCR mostrou, também, heterogeneidade de perfis, cujos graus de similaridade variaram de 55 a 100%. Houve o predomínio de clones circulantes que diferem entre si. Porém, é importante notar que algumas amostras de diferentes hospitais apresentaram o mesmo perfil de bandas entre si. Neste caso, é possível afirmar que sete diferentes populações clonais, que carregam os genes de resistência para (*bla*_{oxa23}, *bla*_{oxa51}) estavam circulando no Hospital Semper (amostras de 01 a 07) e, na Santa Casa, oito populações diferentes, amostras 09, 10, 11, 15, 16, 17, 20 e 21 (Anexo la).

Por outro lado, foi possível verificar, no Hospital Odilon Behrens, diferentes populações clonais (amostras 24, 26, 30,32 e 33; amostras 23,25 e amostras 27 e 29), que tinham em comum a presença dos genes *bla*_{VIM-1}, *bla*_{oxa23} e *bla*_{oxa23}, *bla*_{oxa51}, notando-se o predomínio de algumas populações clonais. Vale ressaltar que a amostra 22 (Santa Casa) apresentou o perfil de bandas mais próximo do encontrado nas amostras do Hospital João XXIII.

No Hospital das Clínicas, verificou-se a ocorrência de seis diferentes populações clonais, incluindo-se as amostras 34; 35 e 39; 36; 37; 41 e 40, 43,44 e 45, amostras estas que continham os genes *bla*_{VIM-1}, *bla*_{oxa23}, *bla*_{oxa23}, *bla*_{oxa51} *bla*_{AmpC} e apresentavam resistência à maioria dos antimicrobianos em estudo. Contudo, no Hospital de João XXIII, foi observado um perfil clonal bastante heterogêneo, com 15 diferentes populações que continham, também, os genes *bla*_{VIM-1}, *bla*_{oxa23}, *bla*_{oxa23}, *bla*_{oxa51} *bla*_{AmpC}. Esse resultado é muito interessante, uma vez que este Hospital, por ser da rede Fundação Hospitalar de Minas Gerais (FHEMIG), recebe pacientes de quase todos os municípios do estado de Minas Gerais.

Os resultados do presente estudo permitem sugerir que as mesmas populações clonais estejam circulando entre Hospitais em estudo, disseminadas por diferentes vias, como os profissionais da área de saúde e pacientes transferidos entre os hospitais.

Rodrigues e colaboradores mostraram que, do total de amostras avaliadas quanto à susceptibilidade a antimicrobianos, 72,5% (29/40) eram resistentes à ceftazidima, 92,5% ao imipenem, muitas das quais apresentavam resistência simultânea para estes antimicrobianos. Aproximadamente, 37,5% das linhagens foram considerados pan-resistentes. Todas as amostras foram sensíveis *in vitro* à polimixina B. O teste fenotípico para detecção de MBL foi positivo em 5% (2/40) das amostras de *P. aeruginosa* isoladas; no entanto, nenhum dos genes investigados (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM}) foi identificado por PCR. A análise molecular gerada pelo PFGE revelou 14 padrões genéticos distintos (A a N), dos quais os perfis A, B, E, F, J e K eram comuns nas duas instituições hospitalares em estudo (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Estudo avaliando a clonalidade de amostras de *A. baumannii* multirresistentes a drogas e produtoras de OXA-23, no sul do Brasil, mostrou que as 227 amostras foram agrupadas em oito tipos distintos de perfis e 31 subtipos eletroforéticos. Dentre estes, predominaram os perfis A, C e F, que corresponderam a 15,9%; 37,5% e 42,7% das amostras, respectivamente (MARTINS *et al.*, 2011).

Assim, como a frequência de linhagens de *P.aeruginosa* e *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos tem aumentado significativamente, e como a indústria farmacêutica não tem lançado uma alternativa terapêutica com um espectro de atividade similar ou superior às drogas desta classe, o atual prognóstico das infecções por bactérias multirresistentes é, muitas vezes, desfavorável. Nesses casos, o panorama atual da antibioticoterapia se restringe a alternativas terapêuticas com fármacos considerados inadequados, devido à sua alta toxicidade, como, por exemplo, as polimixinas (polimixina B e colistina).

A detecção precoce de amostras produtoras de enzimas como as metalobetalactamases e oxacilinasas é de extrema importância e esta detecção nos laboratórios clínicos poderá contribuir para minimizar a ampla disseminação intra-hospitalar das amostras produtoras, pois a maioria dos genes codificadores destas enzimas está em elementos genéticos de alta mobilidade.

A possível existência de um genótipo predominante entre as amostras avaliadas reforça a importância de medidas de intervenção que diminuam a chance de infecção cruzada, como isolamento de contato, melhor adequação da área física dos hospitais e das clínicas e maior adesão às medidas básicas de controle de infecções hospitalares.

7. CONCLUSÕES

- A resistência bacteriana a antimicrobianos, avaliada tanto pelo método de disco-difusão como pela determinação da concentração inibitória mínima, mostrou que são altos os índices de resistência em *P. aeruginosa* e, mais preocupante, ainda, entre as amostras de *A. baumannii*, considerando quase todas as classes de antimicrobianos, à exceção da polimixina B, que ainda é bem efetiva contra *P. aeruginosa*;
- As metodologias utilizadas permitiram evidenciar a produção das enzimas metalo- β -lactamases, oxacilinases e cefalosporinases pelas amostras de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. analisadas, confirmando sua maior frequência nestas últimas.
- Os resultados obtidos com os três testes utilizados para a pesquisa de MBL indicaram maior sensibilidade do Etest e do teste disco-aproximação.
- Dois genes codificadores de metalo- β -lactamases (VIM e SPM), dos cinco pesquisados, foram detectados nas amostras de *P. aeruginosa* avaliadas, sendo, o segundo, na grande maioria delas, e apenas o primeiro detectado na grande maioria das amostras de *A. baumannii*;
- Os genes codificadores de Oxacilinases (*bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA58}) foram encontrados na quase totalidade das amostras de *A. baumannii* estudadas;
- O gene codificador de Cefalosporinase (AmpC) foi predominante e somente encontrado nas amostras de *Acinetobacter* spp. avaliadas;
- Os resultados do presente estudo permitem sugerir que certas populações clonais estejam circulando entre os Hospitais em estudo, disseminadas por diferentes vias, como os profissionais da área de saúde e pacientes transferidos entre os hospitais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED. T., MANFRED, H., JERICHO, J. M., BOYD, AND TERRY J. Nanoscale Characterization and Determination of Adhesion Forces of *Pseudomonas aeruginosa* Pili by Using Atomic Force Microscopy *J. Bacteriol.*, v. 190, p. 2700–2708, 2008.
- AL NAIEMI, N., DUIM, B., BART, A. A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Med. Microbiol.*, v.55, p.1607-1608, 2006.
- ALLEN, DAVID, M., HARTMAN, BARRY. J. *Acinetobacter* Species. in Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 6a edição. New York: Churchill Livingstone, 2005. Cap 219:2632-36.
- ALLERBERGER, F., FRITSCHER, S.J. Use of automated ribotyping of Austrian *Listeria monocytogenes* isolates to support epidemiological typing. *J. Microbiol. Methods*, v.35, p 237-244, 1999.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A., ZHANG, J. ZHANG, Z., MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids. Res.* v.25, p. 3389-3402, 1997.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol Sci.* v.16, p. 321-31, 1980.
- AMINI, S., HOTTES, A.K., SMITH, L.E., TAVAZOIE, S. Fitness Landscape of Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathog.* V.7, 2011.
- ANG, J.Y., EZIKE, E., ASMAR, B.I. Antibacterial resistance. *Indian J Pediatr. Rev.* V.7, p.229-39. 2004.
- ANSTEY, N., CURRIE, M., HASSELL, D., PALMER, et al. Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* sp pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p.685-686, 2002.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Rev. Saúde Pública, vol.38 no.3 São Paulo, June 2004.
- ANZAI, Y., KIM, H., PARK, J. Y., WAKABAYASHI, H., OYAIZU H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 50, p.1563-1589, 2000.

ARAKAWA, Y. Convenient test for screening metallo- β lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.* v. 38, p. 40-3, 2000.

ARORA, S.K., RITCHINGS, B.W., ALMIRA, E. C., *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FlID, is responsible for mucin adhesion. *Infect Immun.* v.66, p.1000–1007, 1998.

ASIKYAN, M.L., KUS, J.V., BURROWS, L. L. Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* v.190, p. 7022-7034, 2008.

BARAN, G., ERBAY, A., BODUR, H., ONGÜRÜ, P. *et al.* Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Int J Infect Dis.* v.12, p.16-21, 2008.

BATISTA, M. A. Presence of the sacred in a critical moment: internment in an unit of intensive therapy *Rev Bras Enferm.* v. 57, p. 579-585, 2004.

BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, v.45, p.493-496, 1966

BAUMANNII, P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bacteriol.* v. 96, p.39-42, 1968.

BAUMANNII, P., DOUDOROFF, M., AND STANIER, R. Y. Study of the Moraxella Group I. Genus *Moraxella* and the *Neisseria catarrhalis* Group *J. Bacteriol.* v. 95, n.1, p. 58-73, 1968.

BECEIRO, A., TOMÁS, M., BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: a beneficial relationship for themicrobial world? *Enferm Infecc Microbiol Clin*, .2012

BELLIDO, F., VEUTHEY, C., BLASER, J. *et al.* , Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP- 4 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemoter.* v.25, p. 57-68, 1990.

BEN, H.A.J., KHALIFA, A., MOISSENET, D., VU THIEN H., KHEDHER, M,. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin (Paris)*, v.69, n.4, p.393-403. 2011.

BEN, R.J., YANG, M.C., HSUEH, J.C., SHIANG, J.C., CHIEN, S.T. Molecular characterization of multiple drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in southern Taiwan. *Agents antimicrob.* v.38, p. 403-8, 2011.

BENNETT, P.M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother*, v.4, p.1- 4, 1999.

BERGOGNE-BEREZIN, E., AND TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* V.9, p. 148-165, 1996.

BERKOW R. Manual Merck de Informação Médica- Ed. Manole - ISBN: 1034-0, 2002, – p. 1624.

- BERTONCHELI, C. M., HORNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.44, p.5, 2008.
- BONOMO, R. A., SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis*, v. 43 Suppl 2:S49-56, 2006.
- BOU, G., AND MARTINEZ-BELTRAN, J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* V.44, n. 5, p.428-432, 2000.
- BOU, G., CERVERO, G., DOMINGUEZ MA, QUEREDA C, MARTINEZ-BELTRAN J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. *J Clin Microbiol*, v.38, p. 3299–05, 2000.
- BOUVET, P. J. M., AND GRIMONT, P.A.D. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur/ Microbiol*, v.138, p. 569-578, 1987.
- BOUZA, S .E, BLAZQUEZ, G. R., RODRIGUEZ-CREIXEMS, M., MORENO, G.S., MIRALLES , M .P. ALONSO, F.R., Bacteremia caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients with AIDS. *Clin Esp Rev*; v.196, p. 698-702, 1996.
- BOUZA, E., GARCIA-GARROTE, F., CERCENADO, E., MARIN, M., DIAZ, M.S, SANCHEZ, R., *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: a multicenter study in 136 hospitals in Spain. *Rev Esp Quimioter*, v. 16, n. 1, p.41-52, 2003.
- BRADLEY, J. S., GARAU, J., LODE, H., ROLSTON, K. V. I., WILSON, S.E., QUINN, J. P. Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *International Journal Antimicrobial Agents*, v. 11, p. 93-100. 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 196, de 24 de junho de 1983. Expede instruções para o controle e prevenção das infecções hospitalares. *Diário Oficial da União*, Brasília, p.113-119, 28 jun. 1983. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2.616, de 13 de maio de 1998. Expede na forma de anexos as diretrizes e normas para a prevenção e controle das infecções hospitalares. *Diário Oficial da União*, Brasília, p.133, 13 mai. 1998. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2.616, de 13 de maio de 1998. Expede na forma de anexos as diretrizes e normas para a prevenção e controle das infecções hospitalares. *Diário Oficial da União*, Brasília, p.133, 13 mai. 1998. Seção 1.

BRASIL. Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar de 6 de janeiro de 1997, Lei 9.431. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do País. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 07 de janeiro de 1997.

BUSH K., AND JACOBY G., updated functional classification of β -lactamases. *antimicrobial agents and chemotherapy*. vol. 54, p. 969–976, n. 4, mar. 2010.

BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*. v. 32, n. 7, p.1085-9, 2001.

BUSH, K., JACOBY, G.A., MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. V.39, n.6, p. 1211-33, 1995.

CARBONNE, A., NAAS, T., BLANCKAERT, K, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1- producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. *J Hosp Infect*, v.60, p.14-8, 2005.

CARVALHAES, C.G., PICÃO, R.C., NICOTETTI, A., XAVIER, D., GALES, A. C. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J. Antimicrob. Chemother*. V.65, n.2, p. 249-251, 2010

CARVALHO, A.P, ALBANO, R.M, DE OLIVEIRA, D. N, CIDADE D. A, TEIXEIRA, L.M, et al. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist*. Summer;v.12, n.2, p.103-8. 2006.

CASTANHEIRA, M. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, v. 48, p. 4654-61, 2004

CASTANHEIRA, M. et al. Characterisation of mobile elements carrying metallo- β -lactamase genes, blaIMP-1, blaIMP-16, blaSPM-1, blaVIM-2 from Latin American Medical Centres: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 2003, p. 153, 2003.

CASTANHEIRA, M., TOLEMAN, M. A., JONES, R.N., SCHMIDT, F.J. et al. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob. Agents. Chemother*, v. 48, n.12, p.4654-61, 2004

CAYO, R., RODRÍGUEZ, M.C., ESPINAL P., FERNÁNDEZ-CUENCA, F., OCAMPO-SOSA, A.A., AYALA, J. A., VILA, J., MARTÍNEZ, MARTÍNEZ-L. Analysis of genes encoding penicillin-binding proteins in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Mem. Inst. Set*. 2011.

CEZÁRIO, R.C.; DUARTE DE MORAIS L., FERREIRA, J.C.; COSTA-PINTO R.M., DA COSTA DARINI, A.L., GONTIJO-FILHO, P.P. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* v. 27, n.5, p. 269-74, 2009.

CHOI, C. H. *et al.* Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cel Microbiol*, v.7, p.1127-1138, 2005.

CHRISTIAN, V AND IGLEWSKI B. H. Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infectin, emergent infection diasese v.3, 1998 .disponivem em, www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no4/vandelden.htm, acesso em 20/6/2010.

CHUNG, H.C. AND LEE, R.P. Multi-resistant bacteria in hospitals: the focus of nursing care. *Za Zhi Li Hu* , v.58, n.4, p.11-15. 2011.

CISNEROS-HERREROS, J. M., GARNACHO-MONTERO, J., PACHON-IBANEZ, M. E. Nosocomial pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*; Suppl 3, p. 46-51, 2005.

CLAEYS, G., VERSCHRAEGEN, G., DE BAERE T., VANECHOUTTE, M. PER-1 β - lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *J antimicrob. Chemoter.* v. 45, p. 924-5, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Suscetibility Testing; *Seventeenth Informational Supplement*. V.27 No.4, M100-S17, 2011.

CORNAGLIA, G., GIAMARELLOU, H., ROSSOLINI, G.M., Metallo- β -lactamases: the last frontier for β -lactam? *Lancet Infect Dis.* , v.11, n.5, p.381-93, Mai. 2011.

COSTA, M.M; SILVA, M.S; SPRICIGO, D.A; WITT, N.M; MARCHIORO, S.B; KOLLING, L.; VARGAS, A.P.C. Caracterizacao epidemiologica, molecular e perfil de resistencia aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatorios suinos do sul do Brasil. *Pesq Vet Bras* n.26, p.5-8, 2006.

COSTERTON J. W., STEWART P. S., GREENBERG E. P., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. V. 284, p. 1318–1322, 1999.

COUDRON, P.E., MOLAND E.S. AND THOMSON K.S. Occurrence and detection of AMP C beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans medical centre. *J. Clin. Microbiol.*, v.38 p.1791-1796, 2000

COUTO, R.C. Infecção hospitalar em centro de terapia intensiva neonatal: fatores de risco e sua relação com o óbito, 2000. 191f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical), Faculdade de Medicina, UFMG, 2000.

- DABROWSKI, W., CZEKAJLO-KOŁODZIEJ, U., MEDRALA, D., GIEDRYS-KALEMBA, S. Optimisation of AP-PCR fingerprinting discriminatory power for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* Jan 21, v.218, n.1, p.51-7, 2003.
- DALMARCO, E. M., BLATT, S. L., CÓRDOVA, C.M. M. Identificação Laboratorial de B-Lactamase de Espectro Estendido (ESBLs) –, *RBAC*, v. 38, 171-177, Revisão, 2006.
- DANCER, S.J. The problem with cephalosporin *journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2001) 48, 463-478.
- DANCHAVIJITR .S, CHUENAROM. W, KACHINTORN. K, TANGTRAKUL. T. Comparison of costs for disposable and reusable syringes and needles in Siriraj Hospital. *J Med Assoc Thai.* V.75, Suppl 2:11 - 15, 1992.
- DECHAMPS, C., POIREL, L., BONNET, R., et al .,Prospective survey of β - lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomona aeruginosa* isolated in French hospital in 2000. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* V.46, p.3031-4, 2002.
- DERETIC, V., SCHURR, M. J., BOUCHER, J. C., MARTIN, D. W., Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoid in cystic fibrosis: Environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J Bacteriol*, v. 176, p. 2273-2780, 1994.
- DIJKSHOORN, L., NEMEC, A., SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol*, v.5, p. 939-951, 2007.
- DRAWZ, S.M.; BABIC, M., BETEL, C.R ., TARACILA, M., DISTLER, A.M., ORI, C., CASELLI, E. F., PRATI, BONOMORA . Inhibition of class C betalactamase in *Acinetobacter* spp: Insights on effective inhibitor design. *Biochemistry.* v. 49, n. 2, p. 329-40, Jan, 2010
- DZIDIC, S., BEDEKOVIĆ, V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacol Sin.* V. 24, p. 519-26, 2003.
- EDIS, E. C., HATİPOĞLU, O. N., TANSEL, O., SUT, N. *Acinetobacter* pneumonia: Is the outcome different from the pneumonias caused by other agents. *Ann. Thorac. Med*, v.5, p. 92-6, 2010.
- EMORI, T.G., GAYNES, R.P. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev.* v. 6, n.4, p.428-42, 1993.
- ENOCH, D.A., BIRKETT, C. I., LUDLAM, H. A. Non-fermentative Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*; v. 29, p. S33-41, 2007.
- EUZÉBY, J.P.2010 List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, www.bacterio.cict.fr/nonvalid.htm. Acesso em 22/07/2010

FERNANDES, A.T., FERNANDES, M.O. , FILHO, N. R. Infecções Hospitalares e suas Interfaces na Área da Saúde. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000.v.2. 1721 p.

FERNANDEZ-CUENCA F. L., MARTINEZ-MARTINEZ, M. C., CONEJO, J. A., *et al* . Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother*; v.51, p. 565-574, 2003.

FERREIRA, A.E., MARCHETTI, D.P., DA CUNHA, G.R., DE OLIVEIRA, L.M., FUENTEFRÍA, D.B., DALL BELLO, A.G., BARTH, A.L., CORÇÃO, G. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. from hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. V. 44, p.725 – 73, 2011.

FERREIRA, A.E., MARCHETTI, D.P., DA CUNHA, G.R., DE OLIVEIRA, L.M., FUENTEFRÍA, D.B., DALL BELLO, A.G., BARTH, A.L., CORÇÃO, G. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. from hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. V. 44, p.725 – 73, 2011.

FIGUEIREDO D. Q., CASTRO, L. F. S., SANTOS, K. R. N., TEIXEIRA, L. M., MONDINO, S. S. B. Detection of metallo-beta-lactamases in hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* *J Bras Patol Med Lab*, v. 45 , n. 3 , p. 177-184, 2009

FIGUEIREDO, D.Q., SANTOS, K.R., PEREIRA, E.M., SCHUENCK, R.P, MENDONÇA-SOUZA, C.R, TEIXEIRA, L.M, MONDINO, S.S. First report of the bla(OXA-58) gene in a clinical isolate of *Acinetobacterbaumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. May, v. 106, n. 3, p.368-70, 2011

FILLOUX , A., Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front Microbiol*. V.2, p.155, 2011.

FINCK-BARBANÇON, V., GORANSON, J. ZHU L., *et al* . ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol*. V. 25, p. 547–557, 1997.

FLEISZIG, S. M., ARORA, S. K, VAN, R., *et al*. A component of the flagellum assembly apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*, plays a role in internalization by corneal epithelial cells.*Infect Immun*. V. 69, p. 4931–4937, 2001.

FOKA, A., CHINI, V., PETINAKI, E., KOLONITSIOU, F., ANASTASSIOU, E.D., DIMITRACOPOULOS G., SPILIOPOULOU, I. Clonality of slime-producing methicillin resistant coagulase-negative staphylococci disseminated in the neonatal intensive care unit of a university hospital. *Clin Microbiol Infect*, v.2, p. 1230-1233, 2006.

- FRANCO, M.R., CAIAFFA-FILHO, H.H., BURATTINI, M.N., ROSSI F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics* v.65, p.9825-9829, 2010
- FRANCO, MARIA RENATA GOMES. Detecção de metalo- β - lactamases em cepas de *pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecções sistêmicas no hospital das clínicas da faculdade de medicina da universidade Ed. São Paulo. 2009.112f. Dissertação (mestrado em ciências) – Faculdade de medicina, universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- FRANK, D. W. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, v. 26, p. 621–629, 1997.
- FUENTEFRÍA, D.B. Detecção de Metallo-B-Lactamase e similaridade genética em isolados de *P.aeruginosa* de efluentes hospitalares e água superficial. Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
- FURTADO, G.H., CAVALCANTE, A.C, MEDEIROS, E.A, GALES, A.C, OLIVEIRA, V.G., GIRARDELO, R. Bloodstream infections with OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in a university-affiliated hospital in Brazil: epidemiology and clinical outcomes. *Am J Infect Control*. V.39, n.8, p.706-8. Oct, 2011.
- GADDY, J. A, ACTIS, L. A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Fut. Microbiol*. V.4, p. 273–8 , 2009.
- GALES, A. C., Tognim, M. C., Reis, A. O., *et al*. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, v.45, p, 77-9, 2003.
- GALES, A. C., JONES, R. N., FORWARD, K. R., LINARES, *et al* . Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin Infect Dis*. v. 32, p.S104-S113, 2001.
- GALLEGO, L. Detección de carbapenemases en clones de *Acinetobacterbaumannii* resistentes a imipenem. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v. 22, n. 5, p.262-266, 2004.
- GARNER, J. S., JARVIS, W. R., EMORI, T. G. ET AL. CDC definitions for nosocomial infections, 1998. *Am. J. Infect. Control.*, v. 16, p. 128-140, 1988
- GARROUSTE-ORGEAS, M., CHEVRET, S., MAINARDI, J.L., TIMSIT, J.F., MISSET, B., CARLET, J. A one-year prospective study of nosocomial bacteraemia in ICU and non-ICU patients and its impact on patient outcome. *J. Hosp. Infect.* v. 44, p. 206-213, 2000.

GAYNES, R., EDWARDS, J.R. . National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. *Clin. Infec. Dis*, v.15, n. 41, p. 848-54. 2005.

GEWIRTZ, A. T., NAVAS, T. A., LYONS, S., *et al.* Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*. V.167, p. 1882–1885, 2001.

GIKAS, A., PEDIADITIS, I., ROUMBELAKI, M., TROULAKIS, G., ROMANOS, J., TSELENTIS, Y. Repeated multi-centre prevalence surveys of hospital-acquired infection in Greek hospitals. CICNet. Cretan Infection Control Network. *J.Hosp. Infect.* V. 41, p. 11 - 18. 1999.

GIRLICH, D. POIREL, L., AND NORDMANN P. Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in *Enterobacteriaceae* *Journal of Clinical Microbiology* p. 477–479

GOEL, V. K., KAPIL A. Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. *BMC Microbiol* , v.1, p. 16–24, 2001.

GOMEZ, G. J., ALCANTARA, V. M., SIMARRO, C. E, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* bacteremias: analysis of prognostic factors. A prospective study, 1992-1998. *Rev Clin. Esp.* v.204, p.452-6, 2004

GONZALEZ, R. H., NUSBLAT, A., NUDEL, B. C. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiol Res*; v.155, p. 271–27, 2001. GONZÁLEZ, R. H., DIJKSHOORN, L., VAN DEN BARSELAAR, M., NUDEL, C. Quorum sensing signal profile of *Acinetobacter* strains from nosocomial and environmental sources *Rev Argent Microbiol.* V.41, p. 73 - 78, 2009. GULAY, Z., BICMEN, M., AMYES, S.G., YULUG, N. Beta-lactamase patterns and betalactam/clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* isolated from fecal samples from healthy volunteers. *J Chemother*, v. 12, p. 208–215, 2002. GUPTA, V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs*, v.17, p.131-43, 2008.

HALL, R. M., COLLIS, C.M., Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol. rev* V.15, n.4, p. 593-600, 1995. HAMMAMI, S., BOUTIBA-BEN BOUBAKER, I., GHOZZI, R., SAIDANI, M., AMINE, S., BEN REDJEB, S. Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- β -lactamase in a kidney transplantation unit. *Diagn Pathol.* V.28, p. 106, 2011.

HAMMAMI, S., BOUTIBA-BEN BOUBAKER, I., GHOZZI, R., SAIDANI, M., AMINE, S., BEN REDJEB, S. Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- β -lactamase in a kidney transplantation unit. *Diagn Pathol.* V.28, p. 106, 2011

HANBERGER, H., DIEKEMA, D., FLUIT, A., JONES R. et al. Surveillance of antibiotic resistance in European ICUs. *J Hosp Infect.* V. 48, p.161-76, 2001

HENRIKSEN, S. D. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriol. Rev.* v. 37, p. 522-561, 1973.

HOLDER, I. A., NEELY, A. N., FRANK, D. W. PcrV immunization enhances survival of burned *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice. *Infect. Immun.* V.69, p. 5908–5910, 2001.

HORAN TC, ANDRUS M, DUDECK MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am. J. Infect. Control.* v.36, p.309-332, 2008.

HORII, T., MURAMATSU, H., MORITA, M., MAEKAWA, M., Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with urinary tract infections during antibiotic therapy. *Microb. Drug. Resist* v. 9, p. 223–9, 2003.

HUANG, Z. M., MAO, P. H. Y., CHEN, WU, L., WU J. Estudo sobre a epidemiologia molecular de SHV tipo β -lactamase de codificação de múltiplos genes-resistente *Acinetobacter baumannii*. Liu Xing Zhonghua Bing Xue Za Zhi v. 25, p. 425-7, 2004.

HUJER, K. M., A. M. HUJER, E. A. HULTEN, S. BAJAKSOUZIAN, J. M. ADAMS, C. J. DONSKEY, D. J. ECKER, C. MASSIRE, M. W. ESHOO, R. SAMPATH, J. M. THOMSON, P. N. RATHER, D. W. CRAFT, J. T. FISHBAIN, A. J. EWELL, M. R. JACOBS, D. L. PATERSON, AND R. A. BONOMO. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* V.50, n.11, p.4114-4123, 2006.

HUJER, K. M., N. S. HAMZA, A. M. HUJER, F. PEREZ, M. S. HELFAND, C. R. BETHEL, J. M. THOMSON, V. E. ANDERSON, M. BARLOW, L. B. RICE, F. C. TENOVER, AND R. A. BONOMO. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* V.49 n.2, p. 2941-2948, 2005.

HWA, W. E, SUBRAMANIAM, G., MANSOR, M. B., YAN, O. S; GRACIE, ANBAZHAGAN D, DEVI SS. Iron regulated outer membrane proteins (IROMPs) as potential targets against carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolated from a Medical Centre in Malaysia *Indian. J. Med. Res.* v.131, p. 578-83, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa da Assistência Médico-Sanitária. Anuário estatístico do Brasil 2006 v.66.

JACCARD, C., TROILLET, N., HARBARTH, S., *et al.* Prospective randomized comparison of imipenem-cilastatin and piperacillin-tazobactam in nosocomial pneumonia or peritonitis. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 42, p. 2966–72, 1998.

JACOBS A. C., HOOD I., BOYD K L., OLSON P D., MORRISON J M., STEVEN . *et al* Inactivation of Phospholipase D Diminishes *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis *Infection and Immunity*, v. 78, p. 1952-1962, 2010.

JACOBY, G.A. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* Jan; v.22 , n.1, p.161-82, 2009.

JAWAD, A. H, SEIFERT, A. M, HERITAGE, J., AND HAWKEY, P. M. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J. Clin. Microbiol.* V.36, p.1938–1941, 1998.

JOHNSON L.B., VENUGOPAL, A.A., PAWLAK, J., SARAVOLATZ, L.D. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection among patients with end-stage renal disease. *Infect. Control .Hosp. Epidemiol.*, v.27, p. 1057-1062. 2006.

JOLY-GUILLOU, M. L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*, *Clin. Microbiol. Infect.* V.11, p. 868 - 873, 2005.

JUAN, C., MACIÁ, M. D., GUTIÉRREZ, O., VIDAL, C., PÉREZ, J. L, OLIVER, A. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* V.49, n. 11, p. 4733-8, 2005.

JYOT, J., BALLOY, V., JOUVION, G., VERMA, A., TOUQUI, L., HUERRE, M., CHIGNARD, M., RAMPHAL, R. Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: in vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. *J Infect Dis.* V. 203, n.10, p.1369-77, 2011

KERR, J. R., MARTIN, H. CHADWICK, M. V., EDWARDS, A., HODSON, M. E, GEDDES, D. M. Evidence against transmission of *Pseudomonas aeruginosa* by hands and stethoscopes in a cystic fibrosis unit. *J. Hosp. Infect*, v, 50, p. 324-6, 2002.

KERSTERS, K., LUD, WIG., VANCANNEYT, M., *et al* . Recent changes in the classification of *pseudomonas*: an overview. *Systematic and applied microbiology*; v.19, p. 465-477, 1996.

KIFFER, C., HSIUNG, A., OPLUSTIL, C., SAMPAIO, J., SAKAGAMI, E., TURNER, P., MENDES, C., MYSTIC BRAZIL GROUP. antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria in brazilian hospitals: the mystic program brazil 2003. *braz j infect dis.* v.9, p.216 - 224, 2005

KIM K.A, WANG M.Y, GRIFFITH P.M, SUMMERS S., LEVY M.L. Analysis of pediatric head injury from falls. *Neurosurg Focus.* V.15, p. 8, 2000.

KISKA, D.L. & GILLIGAN, P.H. 2003. p719-728. *Pseudomonas*. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Tenover, M.C.; & Tenover, R.H. (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Vol. 1. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

KÖHLER, T., PERRON, G.G., BUCKLING, A., VAN DELDEN, C. Quorum sensing inhibition selects for virulence and cooperation in *Pseudomonas aeruginosa* *PLoS Pathog.* V.6, 2010.

KONEMAN, J.G.M., VAN DER BIJL M.W, STOOFF J., VANDENBROUCKE-GRAULS C.M, SAVELKOUL P.H. Antibiotic Resistance is a Major Risk Factor for Epidemic Behavior of *Acinetobacter baumannii*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 22, p. 284-288, 2001.

KORETKE, K. K., LUPAS, P. V., WARREN et al. . Evolution of two-component signal transduction. *Mol Biol Evol.* V.17, p. 1956-1970, 2000.

KIRIKAE T. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* T. *Nihon Rinsho.* v.70, p. 231-235, 2012.

LAMONT, L., BEARE, P. A., OCHSNER, U., et al. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* *PNAS* v. 99, p. 7072-7077, 2002.

LAURETTI, L. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, p. 1584-90, 1999.

LAURETTI, L., RICCIO, M. L., MAZZARIOL, A. et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 43, p. 1584-90, 1999.

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

LEE, K. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 49, p. 4485-91, 2005.

LEE, K., YONG, D., JEONG, S.H., CHONG, Y., Multidrug resistant *Acinetobacter* spp: nosocomial pathogens increasingly problematic *Yonsei Med J.*; v. 52 n.6 p.879-91, nov. 2011

LESSEL, E.F. Subcommittee on nomenclature of moraxella and allied bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* V.21, p. 213-214, 1971.

LEUNG, W. S., CHU, C. M., TSANG, K. Y, et al. . Fulminant community-acquired *acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest.* V.129, p.102-109, 2006.

LIEBERT, C. A, Hall, R. M, Summers, A. O. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbial mol bio rev.* v. 63, p.507-22, 1999.

- LIN, Y.M., WU, S.J., CHANG, T.W., WANG, C.F., SUEN, C.S., HWANG, M.J., CHANG, M.D., CHEN Y.T., LIAO, Y.D. Outer membrane protein i of *Pseudomonas aeruginosa* is a goal of antimicrobial cationic peptide / protein. *J Biol Chem.* v. 285, n.12, p.8985-94, 2010.
- LINCOPAN, N., MCCULLOCH, J. A., REINERT, C., *et al.* First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J. Clin Microbiol.* / v. 43, p. 516-9, 2005.
- LIPMAN, L.J.A; NIJS, A; LAM, TJG M.; GASTRA, W. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. *Vet Microbiol.* n. 43, p.13-19, 1995.
- LISTER, P. D., GARDNER, V. M., SANDERS, C. C. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother.* V.43, n.4, p. 882-9. 1999.
- LIVERMORE, D. M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance *Clin Microbiol Rev.* v. 8, p. 557-84. 1995.
- LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*, v.34, p. 634–40, 2002.
- LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin Infect Dis*, v. 34, n. 5, p. 634-40, 2002.
- LOUREIRO, M. M, MORAES, B. A, MENDONCA, V. L. F, *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa*: Study of antibiotic resistance 86 and molecular typing in Hospital Infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro city, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.97, p. 387-394, 2002.
- MACHADO, M.P., A.B., REITER, K. C., PAIVA, R.M., BARTH, A.L. Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase *staphylococci* from patients attending a tertiary Hospital In Southern Brazil. *J. Med. Microbiol.* v.56, p.1328-1222, 2007.
- MATSUNAGA, N. *Acinetobacter* spp. *nihon rinsho.* v.70, p.236 – 242, 2012.
- MAGNET, S., COURVALIN, P., LAMBERT, T. Resistance-modulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother*, v.45, p. 3375–8, 2001

MAI, G.T., SCOW, W. K, PIER, G.B, McCORMACK, J.G, THONG, Y.H. Supression of lymphocyte and neutrophil function by *Pseudomonas aeruginosa* mucóide exopolysaccharide (alginate): Reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. *Infect Immun* , v. 61, p. 559-564, 1993.

MAJIDUDDIN, F.K., MATERON, I.C., PALZKILL, T.G. Molecular analysis of β -lactamase structure and function *Int J Med Microbiol* v. 292, p.127 -137, 2002.

MARRA, A.R., CAMARGO, T. Z. S., GONÇALVES. P. Preveting cateter- associated Urinary trat infection in the Zero – tolerance era. *Americam journal of infection controls* 2011.

MARRA, A.R., GONZALO, M.L.B., WENZEL, R.P., EDMON, M.B. Comparison of severity of illness scoring systems for patients with nosocomial bloodstream infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Infectious Diseases*, v. 6, p. 132, 2006.

MARTIN G.S., MANNINO D.M., EATONS S., MOSS M. The epidemiology of sepsis in the Unites States from 1970 through 2000. *N Eng J Med*. V. 348, p. 1546-54, 2003.

MARTINS, A.F., KUCHENBECKER, R.S., PILGER, K.O., PAGANO, M., BARTH, A.L. . High endemic levels of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control*. 2011.

MASEDA G. E., ALVAREZ, J., GARNACHO-MONTERO J, JEREZ V, LORENTE L, RODRÍGUEZ O. Update on catheter related bloodstream infections in ICU patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Supl 4, p.10-15, 2011.

MATAR, G.M., CHAAR, M.H., ARAJ, G.F., SROUR, Z., JAMALEDDINE, G., HADI, U. Detection of a highly prevalent and potentially virulent strain of *Pseudomonas aeruginosa* from nosocomial infections in a medical. Center. *BMC Microbiology*, v.5, p. 29, 2005.

MAURER, J. J.; LEE, M. D.; LOBSINGER, C.; BROWN, T.; MAIER, M.; THAYER, S. G. Molecular typing of avian *Escherichia coli* strains isolated by random amplification of polymorphic DNA. *Avian Dis*. n.42, p.431-451, 1998.

MCDONALD, L. C., BANERJEE, S. N., JARVIS, W.R. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987–1996. Nosocomial Infections Surveillance System. *Clin Infect Dis*; v.29, p. 1133–1137, 1999.

MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Disease*; v. 24, p .S19-S45. 1997.

MENDES RE, CASTANHEIRA M, PIGNATARI AC GALES AC. Metallo- beta- lactamase.J Bras Patol Med Lab. V. 42, p.103-13, 2006.

MENDES RE, TOLEMAN MA, RIBEIRO J, SADER HS, JONES RN, WALSH TR: Integron carrying a novel metallo- β -lactamase gene, bla IMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac(6)-30/aac(6)-Ib : report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* v. 48, p. 4693–4702, 2004.

MENDES, R. E., TOLEMAN, M. A., RIBEIRO, J. *et al.* Integron Carrying a Novel Metallo β -Lactamase Gene, blaIMP-16, and a Fused Form of Aminoglycoside-Resistant Gene aac(6)-30/aac(6)-Ib:Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents. Chemother*, v.48, p. 4693-702, 2004.

MEYER, J. M., NEELY, A., STINTZI, A., GEORGES, C., HOLDER, I. A. Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa* *Infect. Immun* v. 64, p.518–523, 1996.

MULCAHY, H., CHARRON-MAZENOD L., LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* V.4, p.100-113. 2008.

MULLER, C.; PLÉSIAT, P., JEANNOT, K., A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. V. 55, p.1211-21, 2011

MURRAY, T. S. AND BARBARA, I. K *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Sliding Motility in the Absence of Type IV Pili and Flagella *J Bacteriol.* V.188, p. 370–377, 2006.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER M.A.; Microbiologia médica . 5º ed. Rio de Janeiro . elsevier, 2006. p. 978.

NAAS T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* V.5, n.11, p.865-79. Review. 1999.

NAGANO, N., NAGANO, Y., CORDEVANT, C., SHIBATA, N., ARAKAWA. Y. Nosocomial transmission of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol*; 42:3978–84. 2004.

NARTEN, M., ROSIN, N., SCHOBERT, M., TIELEN, P. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract isolates and influence of urinary tract conditions on antibiotic tolerance. *Curr Microbiol.* V.64, p. 7-16, 2012

National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control.* V.32, n.8, p. 470-85, 2004.

- NEMEC, A. DIJKSHOORN, L., AND VAN DER REIJDEN, T. J. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J. Med. Microbiol.* V. 53, p. 147-153, 2004.
- NORDMANN, P., POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect Rev.* v. 8, n.6, p. 321-31. 2002.
- NOUÉR S. A., Aspectos clínicos e fatores de risco relacionados com colonização ou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, 2005 Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005
- OCHS, M. M, MCCUSKER, M. P, BAINS M, HANCOCK, R. E. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob. Agents. Chemother*; v.43, p.1085–90, 1999.
- OLIVEIRA, M. S. Tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. Resistentes a carbapenem, 2007. 98p. Dissertação de mestrado em Ciências - São paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.
- O'MALLEY, Y.Q., RESZKA, K. J., RASMUSSEN, G. T., ABDALLA, M. Y., DENNING, G. M, BRITIGAN B.E. The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* V.285, p.1077-86, 2003
- OSANO E, ARAKAWA Y, WACHAROTAYANKUN R, *et al.*, Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* V.38, n.1, p.71-8, 1994
- O'TOOLE, G. A, KOLTER R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* V.30, p.295–304, 1998.
- PADOVEZE, M. C., TRABASSO, P., BRANCHINI, M. L. Nosocomial infections among HIV-positive and HIV-negative patients in a Brazilian infectious diseases unit. *Am J Infect Control* v.30, p.346-50, 2002.
- PALLERONI NJ. Introduction to the aerobic pseudomonads. In: Collier L, Balows A, Sussman M., editors. Topley & Wilson's microbiology and microbial infections-*Systematic bacteriology*. 9. New York: 1998. 1091-108. (36).
- PALLERONI, NJ. Genus I. *Pseudomonas*. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B: The Proteobacteria*. Springer, New York, 2005 pp. 323–379.

PAULSEN, I. T, BROWN, M. H, AND SKURRAY, R. A. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev.* v.60, p.575-608, 1996.

PEIX, A., RAMÍREZ-BAHENA, M. H, VELÁZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas* Infection, *Infect Genet Evol Rev* , v.9, p. 1132-47, 2009.

PELEG, A. Y, SEIFERT, H., PATERSON, D.L: *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* v.,21, p.538-582, 2008.

PEREZ, F. HUJER A. M., HUJER, K. M., *et al.* Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* v.51, p. 3471-3484, 2007.

PEREZ, F. *et al.* Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 51, n. 10, p. 3471-84, 2007.

PICÃO, R.C., ANDRADE, S.S., NICOLETTI, A.G., CAMPANA, E.H, MORAES, G.C., MENDES, R.E., GALES, A.C. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol.* V.46, p.2028-2037. 2008

PITTET, D., TARARA, D., WENZEL, R.P. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients, Excess length of stay, extra costs and attributable mortality. *JAMMA*, v.271, p. 1598-1601, 1994.

POH, C. L.; YEO, C. C.; TAY, L. Genome fingerprint by pulsed field gel electrophoresis and ribotyping to differentiate *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 11, p. 817-822, 1992.

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

POIREL, L. M, MAGALHAES M, AND NORDMANN P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 48:1406-1409, 2004.

POIREL, L., MENUTEAU, O., AGOLI, N., CATTOEN, C., NORDMANN, P. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol*, v.41, p.3542-7, 2003.

POIREL, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ J. M., AL NAIEMI, N., DEBETS-OSSENKOPP, Y. J., NORDMANN, P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother*; v. 54, n. 3, p.2420–24, 2010

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell DaB, editor. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5. New York: Churchill Livingstone; 2000. 2310

- QUALE, J., BRATU, S., LANDMAN, D., HEDDURSHETTI, R., Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin. Infect Dis*; v.37, p. 214–20, 2003.
- QUEENAN, A.M., & BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 20, p. 440-458, 2007.
- RAYMOND, J., AUJARD Y. Nosocomial infections in pediatric patients: a European, multicenter prospective study. European Study Group. *Infect Control Hosp Epidemiol.* V.21, p. 260 - 263. 2000.
- REMOLD, S.K., BROWN, C.K., FARRIS, J.E., HUNDLEY, T.C., PERPICH, J. A., PURDY, M.E., Differential habitat use and niche partitioning in human homes by pseudomonas species *Microb Ecol* ; v.62, n.3, p.505-17, Oct. 2011
- RESENDE A.C.B Detecção de microrganismos presentes no efluente hospitalar e na estação de tratamento de esgotos de Goiania, Presença de Bacterias Gram-negativas Resistentes aos antimicrobianos Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais e saúde , Universidade católica de goiás , 2009.
- ROBINSON, A., BRZOSKA, A.J., TUNER, K., WITHERS, R., HARRY, E.J., LEWIS, P.J., AND DIXON, N.E. Essential Biological Processes of an Emerging Pathogen: DNA Replication, Transcription and cell Division in *Acinetobacter* spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*; v.74, 273-297, 2010.
- ROCA, I., ESPINAL, P., MARTÍ, S., VILA, J. First identification and characterization of an AdeABC-like efflux pump in *Acinetobacter* genomospecies 13TU. *Antimicrob Agents Chemother.* v.55, p.1285-6, 2011
- ROHLF, J.F. 2000. NTSYS – pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exeter Software. Setauket. NY.
- ROSIN, N., SCHOBERT, M., TIELEN, P. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract and Influence of Urinary Tract Conditions on Tolerance to antibiotics . *Curr Microbiol. out.* 2011
- ROSSAU, R., VAN LANDSCHOOT, M., GILLIS, AND J. DE LEY. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accomodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* V.41, p. 310-319, 1991.

RUMBO, M., NEMPONT, C., KRAEHNBUHL, J. P., SIRARD, J. C. Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS Lett.* V. 580, p. 2976–2984, 2006.

SABATÉ M. & PRATS G. Structure and function of integrins *Enferm Infecc Microbiol Clin.* V.20, p. 341-5. 2002.

SABATIER, C., PEREDO, R., VALLÉS, J. Bacterial bloodstream infections in critical patients *Med Intensiva.* v.33, n.7, p.336 - 345, 2009.

SADER, H. S., PIGNATARI, A. C., LEME, I. L.; BURATINI, et al. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.17, p.13-18, 1993

SADER, H., GALES, A. C., PFALLER, M. A., MENDES, R. E., ZOCCOLI C, BARTH, A, JONES RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz J Infect Dis.* V.5, p. 200-14, 2001.

SADER, H. S. et al. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microb Infect*, v. 11, p. 73-6, 2005

SADER, H. S., VENDAVALAIS, A. C., PFALLER, M. A., et al. Patógeno frequência e padrões de resistência em hospitais brasileiros: síntese dos resultados dos três anos do SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* v. 5, p.200-14, 2001.

SADER, H.S., GALES, A.C., SILVA, J.B., PIGNATARI, A.C. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001 *Braz. J. Infect. Dis.* v. 8 p. 25-79, 2004.

SAIER M.H. Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiol. Rev.* v.58 p. 71-93, 1994

SAIMAN L., SIEGEL, J., INFECTION CONTROL IN CYSTIC FIBROSIS. *Clinical Microbiology rev*, v.17,;p. 57-71. 2004.

SAMPAIO-CARNEIRO, M & COUTINHO, A. Immunity to Microbes: Lessons from Primary Immunodeficiencies. *Infection & Immunity*, v.75, p.1545–1555, 2007.

SÁNCHEZ, A., GATTARELLO, S., RELLO, J. New treatment options for infections caused by multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli. *Semin Respir Crit Care Med.* v.32, n.2, p.151-158, 2011.

- SANGER, F., NICKELLEN, S. AND COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* v.74 p. 5463-5467, 1977.
- SANGER, F., NICKELLEN, S. AND COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* v.74 p. 5463-5467, 1977.
- SANTOS FILHO, L. *et al.* Determinação da produção de metalo- β -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. *J Bras Patol Med Lab*, 2002;38:79-84.
- SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*. V.4, p.219, 2003.
- SCHEFFERS DJ, PINHO MG, Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev*, v.69, p.585-607, 2005.
- SCHRECKENBERGER, P. C. Practical Approach to the Identification of Glucose-nonfermenting Gram-negative Bacilli. A Guide Identification. Chicago: Univ. Illinois, College of Medicine at Chicago, 2000.
- SEGAL, H., GARNY, S., ELISHA, G. Is ISABA-1 customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiology Letters* v.243 p.425–429, 2005.
- SEIFERT H, STRATE A, SCHULZE A, PULVERER G: Bacteremia due to *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii*. *Infection*, v.22, p.379-385, 1994.
- SEIFERT, H., L. DIJKSHOORN, P. GERNER-SMIDT, N. PELZER, I. TJERNBERG, AND M. VANECHOUTTE. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of
- SEKIGUCHI, J.; MORITA, K., KITAO, T., WATANABE, N., OKAZAKI, M., MIYOSHI-AKIYAMA, T., KANAMORI, M., KIRIKAE, T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. V.52 n.11 p. 4194-7, 2008.
- SHAVER CM, HAUSER AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun*. V.72, p. 6969–6977, 2004.
- SHOPSIN, B., & KREISWIRTH, B. N. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* v.7, p. 323–326, 2001.
- SIEMANN S, BREWER D, CLARKE AJ, DMITRIENKO GI, LAJOIE G, VISWANATHA T. IMP-1 metallo-beta-lactamase: effect of chelators and assessment of metal requirement by electrospray mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Jul 3;1571(3):190-200.

SILBERT, S., PFALLER M. A., HOLLIS, R. J., BARTH, A. L., SADER, H. S. evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative gram-negative bacilli infection control and hospital epidemiology, v. 25, 2004.

SILBERT, S., PFALLER M. A., HOLLIS, R. J., BARTH, A. L., SADER, H. S. evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative gram-negative bacilli infection control and hospital epidemiology, v. 25, 2004.

SMITH, R.S., AND IGLEWSKI, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target *J Clin Invest.* V.112, p.1460–1465, 2003.

SOARES F.C DA S, perfil de susceptibilidade e tipagem molecular de *Acinetobacter* spp multirresistente em um hospital universitário no sul do Brazil, 2006 Dissertação de mestrado em Ciencias médicas- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre , 2006.

SPIR, P.R.N. Epidemiologia das infecções de corrente sanguínea de origem hospitalar em hospital de atenção terciária em São Paulo, Brasil. 2007 Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2007.

STANIER , PALLERONI NJ, DOUDOROFF M, The aerobic *pseudomonads*: a taxonomic study. *Journal of general microbiology*, v.42, p.159-27, 1966.

STEERS E. THE MECHANISM OF ACTION OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS. *MD STATE MED J.* V.5, P.252-258, 1956

STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D.G., COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology.* v.56, p.187–209, Suppl 1:S139-S145. 2002.

TAKASE, H., NITANAI, H., HOSHINO, K., OTANI, T. impact of Siderophore Production on *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Immunosuppressed Mice *Infect Immun* v.68, p.1834–1839, 2000.

TAKEDA, S., NAKAI, T., IKEDA, F., HATANO, K. Overproduction of a Metallo- β -Lactamase by a Strong Promoter Causes High-Level Imipenem Resistance in a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy*; v. 54, p. 181–187, 2008.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, v.24, p.1596-1599, 2007.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, v.24, p.1596-1599, 2007.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33, p.281-301, 2000.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J.Infect. Control* .Rev. v.34(5 Suppl 1):S3-10; S64-73. 2006

TERESA, C.; HORAN, M.P.H., ANDRUS, R.N., MARGARET, A., DUDECK. CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting , *Am J Infect Control* MPH Atlanta, Georgia v. 36 n. 5 p.309-32, 2008.

TERESA, C.; HORAN, M.P.H., ANDRUS, R.N., MARGARET, A., DUDECK. CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting , *Am J Infect Control* MPH Atlanta, Georgia v. 36 n. 5 p.309-32, 2008.

THEAKER ,C., AZADIAN, B., SONI, N. The impact of *Acinetobacter baumannii* in the intensive care unit. *Anaesthesia* v.58, p.271–274. 2003.

THOMAS, C.L., O'ROURKE, P.K., WAINWRIGHT, C.E. Clinical outcomes of Queensland children with cystic fibrosis: a comparison between tertiary centre and outreach services. *Med J Aust.* v. 188, p.135 - 139, 2008.

TODAR, K. Todar's online Textbook of bacteriology. Madison (Wisconsin) 2008. <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html> . Acesso em 26 jul. 2010.

TOGNIM, M. C. Dissemination of IMP-1 metallo- β -lactamase producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2006.

TOLEMAN, M. A. *et al.* Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemothe*, v.50, p.673-9, 2002,

TOLEMAN, M.A., SIMM, A.M., MURPHY, T.A., GALES, A.C., BIEDENBACH, D.J., JONES, R.N., Molecular Characterization of SPM-1, a novel metallo-B.lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*, v. 50, p. 673-679, 2002.

TOWNER, K.J, *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect.* v.73, p.355-363, 2009.

TURNER, P. J., GREENHALGH, J. M Study Group (Europe). The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997–2000. *Clin Microbiol Infect.* V.9, p.563–567, 2003.

TURTON, J.F., KAUFMANN, M.E., GILL, M.J., PIKE, R., SCOTT, P.T, FISHBAIN, J., CRAFT, D., DEYE, G., RIDDELL, S., LINDLER, L.E., PITT, T. L. Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. *J.Clin. Microbiol.* V.44, p. 2630 - 2634, 2006;

VAHABOGLU H, OZTURK R, AYGUN G, *et al.* Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*; v.41,p. 2265–9, 1997.

VALLENET, D., NORDMANN P, BARBE V, POIREL L, MANGENOT S, BATAILLE E, ET AL. Comparative analysis of *Acinetobacter*: three genomes for three lifestyles. *PLoSOne* v.19, p.1805, 2008.

VASQUE, J., ROSSELLO, J., ARRIBAS JL. Prevalence of nosocomial infections in Spain: EPINE study 1990–1997. EPINE Working Group. *J Hosp Infect* v.43: S105–S111. 1999;

VEESENMEYER, J.L, HAUSER, A. R., LISBOA, T, RELLO J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies *Crit Care Med.* v.37 p.1777 - 1786, 2009.

VERSALOVIC J; KOEUTH T; LUPSKI JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*; v.19, p. 6823-6831, 1991.

VIDAL, R., DOMINGUEZ, M., URRUTIA H, BELLO H, GONZALEZ G, GARCIA A, *et al.* Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Microbios*; v.86, p.49–58. 1996.

VIDAL, F., MENSA, J., MARTINEZ, J. A., ALMELA M, MARCO F, GATELL JM *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* v.18, p.473-7. 1999.

VILA J, MARCOS A, MARCO F. *In vitro* antimicrobial production of β -lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*;v.37, p.138–41. 1993.

VILLEGAS, M. V, LOLANS, K., CORREA, A., KATTAN, J. N, LOPEZ, J.A., QUINN, J. P, *et al.* First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenemhydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*.;v.51, p1553 – 5, 2007.

VINCENT JL, BIHARI DJ, SUTER PM, BRUINING HA, WHITE J, NICHOLAS-CHANOINE MH. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European prevalence of infection in intensive care study. *EPIC International Advisory Committee. JAMA* v.274,p.39–644. 1995

VON BAUM H, MARRE R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int J Med Microbiol* v.295, p.503–511, 2005.

WALSH TR, TOLEMAN MA, POIREAL L, NORDMANN P. Metallo-beta –lactamases: the quiet before the storm ? *Clin Microbiol Rev.*v.18, p.306-25. 2005.

WALSH TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis.* V.21, p.:367-71, 2008

WALSH, T.R., BOLMSTRÖM, A., QWÄRNSTRÖM, A., GALES, A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol.* V.40, p.2755-9. 2002.

WALSH, T. R. *et al.* Evolution of an integron carrying *bla_{VIM-2}* in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother*; v.52, p.116-9, 2003.

Walsh, T.R. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents.* v.36, Suppl 3:S8-14. Review. 2010

WALTHER-RASMUSSEN., HØIBY, J., J.OXA-type carbapenemases. *J Terapêutica Antimicrob.* V. 57, n.3, p.373-83, 2006.

WANG, J.T., MCDONALD, S.C., CHANG, AND HO M. Community-acquired *Acinetobacter baumannii* bacteremia in adult patients in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* V.40, p. 1526-1529, 2002.

WATERS V, LARSON E, WU F, SAN GABRIEL P, HAAS J, CIMIOTTI J *et al.* Molecular epidemiology of gram-negative bacilli from infected neonates and health care workers' hands in neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis*; v. 38p. 1682-1987, 2004.

WELDHAGEN GF, POIREL L, NORDMANN P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* v.47, n.8, p.2385-2392, 2003.

WIBLIN RT. pneumonia nosocomial. In: Wenzel RP, editor. *Prevenção e controle das infecções hospitalares*. 3 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1997. p. 807-819.

WILSON, L. A.; SHARP, P. M. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus.

WISPLINGHOFF H, EDMOND MB, PFALLER MA, JONES RN, WENZEL RP, SEIFERT H. Nosocomial blood stream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals:

clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* v.31: p. 690–697, 2000

WISPLINGHOFF H, T., BISCHOFF, S.M., TALLENT, H., SEIFERT, WENZEL, R.P, EDMOND M.B. Infecções da corrente sanguínea nosocomiais em hospitais E.U.: análise de 24.179 casos de um estudo de vigilância por todo o país em perspectiva. *Clin Infect Dis* V. 39, p.309-17, 2004.

WOLTER DJ, KURPIEL PM, WOODFORD N, PALEPOU MF, GOERING RV, HANSON ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother* v. 53, p.557-62. 2009.

WOODFORD, N., FAGAN, E. J, ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. V.57, p.154-5. 2006.

WU C.J. , LEE, H.C. , NY LEE , SHIH, H.I., KO, N.Y. , WANG, L.R., KO, W.C. Predominance of Gram-negative bacilli and increasing antimicrobial resistance in nosocomial bloodstream infections at a university hospital in southern Taiwan, 1996-2003. *J Immunol Microbiol Infect*. V.39, n.2, p.135-43, Abr. 2006.

WU, D.C., CHAN, W.W., METELITSA AI, FIORILLO, L., LIN, A.N., Pseudomonas infection of the skin: clinical features, epidemiology and management. *Am J Clin Dermatol*. v. 12, n. 3, p.157-69, jun. 2011.

YAN, J. J., HSUEH, P. R., KO, W.C., ET AL . Metallo- beta lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the Vim.2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemoter.*; v.45, p.2224 - 2228, 2001.

YANG, M.A ., LEE, J, CHOI, E.H., LEE, H.J. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in children over 10 consecutive years: analysis of clinical features, risk factors for multi-drug resistance and clinical outcomes. *J Med Sci-coreano* ; v.26, p.612-8. 2011.

YANG, H.J., LI, M.C., , WEI, D.S. , XING, L.J . Characterization of the gene of *Pseudomonas aeruginosa* pcr2. *Wei Sheng Wu Xue Bao* ; v.47, p.779-84, Oct. 2007.

YONG D, LEE K, YUM JH, SHIN HB, ROSSOLINI GM, CHONG Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. V.40, p.3798-801, 2002

YONG, D., SHIN, J.H, KIM, S. High prevalence of PER-1 extended spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* v.47, p.1749-51. 2003.

YONG, D., BELL J.M., RITCHIE, B., PRATT, R., TOLEMAN, M.A., WALSH, T.R., A novel subgroup metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from

Australia. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Chicago, USA; Sept 17–20, 2007. C1-1417.

YONG, D.; TOLEMAN, M.A., GISKE, C.G., CHO, H.S., SUNDMAN, K., LEE, K., WALSH, T.R., Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* V.53, n.12, p. 5046-54. Dec 2009

ZANETTI G, BALLY F, GREUB G, *et al.* Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. *Antimicrob Agents Chemother*; v.47, p.3442–7, 2003

ZAPUN A, CONTRERAS-MARTEL C, VERNET T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev.* v.32, p.361-85, 2008.

ZAVASCKI, A. P., GOLDANI, L. Z., GONÇALVES, A. L, MARTINS, A.F., BARTH, A. L. High prevalence of metallo-beta-lactamase-mediated resistance challenging antimicrobial therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital. *Epidemiol Infect.* V.135, p. 343-5, 2007.

ZAVASCKI, A.P., CARVALHAES, C.G., PICÃO, R.C, GALES, A.C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* V.8, n.1, p.71-93, Review, 2010

ZHANG, Z., LOUBOUTIN, J.P., WEINER, D.J. *et al.* Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. *Infect Immun.* ;v.73, p. 7151–7160, 2005.

ZHANG, J., XU, K., AMBATI, B., YU, F. S. Toll-like receptor 5-mediated corneal epithelial inflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* ,v.44, p.4247–4254, 2003.

Zhao, W.H. , Hu, Z.Q *Acinetobacter*: a potential reservoir and dispenser for β -lactamases *Crit Rev Microbiol.* Out, 2011.

ZIMBLER, D.L., PENWELL, W. F., GADDY, J.A., MENKE, S.M, TOMARAS, A. P, CONNERLY, P. L, *et al.* Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals* v.22, p.23–3, 2009.

www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/index.htm)

www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html

www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12583897>

<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

ANEXO A

Dados referentes aos setores de origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *P.aeruginosa* (n=40) recuperadas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte

HOSPITAL	SETOR	DATA	Código Amostra	IMI			MERO			CAZ			CPM			CIP			LEV		
				DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC	
					Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.
SP	CTI	Dez/08	1	I	256	R	I	64	R	R	>512	R	R	>512	R	R	8	R	R	16	R
	CTI	Dez/08	2	S	4	S	S	2	S	R	128	R	R	128	R	R	64	R	R	32	R
	CTI	Dez/08	3	S	4	S	S	0,5	S	S	2	S	S	2	S	S	0,125	S	S	0,5	S
SC	CTI	Mar/09	4	R	32	R	R	8	I	R	128	R	R	128	R	R	128	R	R	128	R
	CTI	Mar/09	5	R	>512	R	R	128	R	R	64	R	R	64	R	R	128	R	R	128	R
	ONC	Nov/09	6	S	2	S	S	0,5	S	S	1	S	S	4	S	S	0,125	S	S	0,5	S
	CTI	Nov/09	7	R	>512	R	R	128	R	R	>512	R	R	>512	R	R	128	R	R	128	R
	CTI	Mai/09	8	R	8	I	R	8	I	S	8	S	S	8	S	R	0,25	S	R	0,5	S
	CTI	Jan/09	9	S	2	S	S	0,5	S	S	2	S	S	2	S	S	0,125	S	S	0,5	S
	CTI	Mar/09	10	R	64	R	R	16	R	R	64	R	R	32	R	R	8	R	R	8	R
	ENF	Abr/09	11	S	4	S	S	0,5	S	R	32	R	S	4	S	R	4	R	R	4	I
	ENF	Abr/09	12	S	2	S	S	1	S	S	8	S	S	4	S	S	0,125	S	S	1	S
OB	EXT	Fev/09	13	R	32	R	R	16	R	R	64	R	R	32	R	R	32	R	R	16	R
	CTI	Mar/09	14	S	2	S	S	1	S	S	2	S	S	4	S	R	4	R	S	0,5	S
	CM	Mar/09	15	S	2	S	S	2	S	S	2	S	S	2	S	S	0,125	S	S	0,5	S
	CM	Abr/09	16	S	2	S	S	4	S	S	4	S	S	8	S	S	0,125	S	S	0,5	S
HC	ENF	Fev/09	17	S	2	S	S	2	S	S	8	S	S	8	S	S	0,125	S	S	0,5	S
	ENF	Abr/09	18	S	4	S	S	0,5	S	R	64	R	R	64	R	R	32	R	S	1	S
	ENF	Mai/09	19	R	32	R	R	16	R	R	64	R	R	64	R	R	8	R	R	16	R
	ENF	Mai/09	20	S	4	S	S	0,5	S	I	8	S	S	4	S	S	0,125	S	S	0,5	S
	ENF	Mai/09	21	S	2	S	S	0,5	S	S	2	S	S	8	S	S	0,125	S	S	0,5	S
	ENF	Out/09	22	S	2	S	S	1	S	S	1	S	S	1	S	S	0,125	S	S	0,5	S
	ENF	Nov/09	23	S	4	S	S	0,5	S	S	8	S	S	2	S	S	0,125	S	S	1	S
	CTI	Mar/09	24	R	64	R	R	16	R	S	2	S	S	4	S	S	0,125	S	S	0,5	S

JXXIII	CTI	Mar/09	25	R	64	R	R	16	R	R	128	R	R	> 512	R	S	0,125	S	S	0,5	S
	CTI	Abr/09	25	R	64	R	R	16	R	R	128	R	R	> 512	R	R	4	R	S	0,5	S
	ENF	Abr/09	27	S	4	S	S	4	S	R	64	R	R	>512	R	S	16	R	R	32	R
	UTQ	Mai/09	28	S	2	S	S	2	S	S	4	S	S	4	S	S	2	I	S	2	S
	UTQ	Abr/09	29	R	64	R	R	16	R	R	64	R	S	2	S	R	16	R	R	32	R
	CGP	Abr/09	30	S	2	S	S	0,5	S	S	4	S	S	1	S	S	0,125	S	S	0,25	S
	CGP	Mai/09	31	R	32	R	R	16	R	S	1	S	S	4	S	S	0,125	S	S	0,25	S
	UTI	Abr/09	32	S	4	S	S	4	S	S	8	S	S	4	S	R	8	R	S	4	I
	UTQ	Abr/09	33	R	32	R	R	16	R	I	32	R	I	32	R	R	32	R	R	16	R
	CTI	Mar/09	34	R	32	R	R	16	R	I	16	I	I	32	R	R	32	R	R	32	R
	SEC	Abr/09	35	S	4	S	S	0,5	S	S	2	S	S	2	S	S	0,125	S	S	0,5	S
	CTI	Mar/09	36	R	64	R	R	32	R	I	16	I	I	32	R	R	32	R	R	32	R
	UTQ	Mai/09	37	R	16	R	R	16	R	R	16	I	R	32	R	R	32	R	R	16	R
	SEC	Fev/09	38	S	2	S	S	1	S	R	>512	R	R	>512	R	R	16	R	S	4	S
	CTI	Mai/09	39	R	16	R	R	16	R	S	4	S	R	32	R	S	4	R	R	32	R
	UTQ	Abr/09	40	S	2	S	S	1	S	R	2	S	R	4	S	R	0,125	S	R	0,125	S

IMI: Imipenem, MER: Meropenem, CAZ: Ceftazidima, CPM: Cefepime, ATM: Aztreonam, PTZ: Piperacilina /Tazobactam, CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina, AMI: Amicacina, GEN: Gentamicina, POL: Polimixina B. Disco-Difusão (DD) e Concentração inibitória mínima (CIM), CM: clínica médica; CTI: centro de terapia intensiva; Enf: enfermarias; Ext: externo; UTQ: unidade de terapia de queimados; UTI: unidade de terapia intensiva; ONC: oncologia; SEC: Serviço de emergência clínica; Conc: concentração; Interp: Interpretação, SP: Hospital Semper; SC: Santa Casa de Misericórdia; OB: Hospital Odilon Behrens; HC: Hospital de Clínicas; JXXIII: Hospital João XXIII

ANEXO A

“Continuação”. Dados referentes aos setores de origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *P.aeruginosa* (n=40) recuperadas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte

Hospital	SETOR	DATA	Código amostra	AZT			PTZ			AMI			GEN			POL		
				DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC	Interp.	DD	MIC	Interp.
					Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.						
SP	CTI	Mar/08	1	S	8	S	R	256	R	R	> 512	R	R	64	R	S	0,25	S
	CTI	Mar/08	2	S	4	S	R	64	S	R	32	I	S	1	S	S	1	S
	CTI	Set/08	3	S	8	S	S	8	S	S	8	S	S	1	S	S	0,25	S
SC	CTI	Mar/09	4	R	32	R	R	32	S	R	8	S	R	> 512	R	S	0,5	S
	CTI	Mar/09	5	R	32	R	S	512	R	S	4	S	S	4	S	S	0,5	S
	ONC	Nov/09	6	S	2	S	S	4	S	S	8	S	S	4	S	S	0,5	S
	CTI	Nov/09	7	R	32	R	R	512	R	S	8	S	R	> 512	R	S	0,5	S
	CTI	Mai/09	8	R	32	R	I	16	S	I	8	S	R	> 512	R	S	0,125	S
	CTI	Jan/09	9	S	4	S	S	64	S	S	8	S	S	2	S	S	0,125	S
	CTI	Mar/09	10	R	512	R	S	64	S	R	32	I	R	8	I	S	0,25	S
	ENF	Abr/09	11	S	2	S	S	8	S	S	4	S	S	2	S	S	0,25	S
OB	EXT	Fev/09	13	R	32	R	S	64	S	S	8	S	S	4	S	S	0,25	S
	CTI	Mar/09	14	S	8	S	S	16	S	S	4	S	R	> 512	R	S	0,25	S
	CM	Mar/09	15	S	8	S	S	8	S	S	1	S	S	2	S	S	0,25	S
	CM	Abr/09	16	S	8	S	S	16	S	S	1	S	S	4	S	S	0,25	S
HC	ENF	Fev/09	17	S	4	S	S	64	S	S	4	S	S	> 512	R	S	0,25	S
	ENF	Abr/09	18	S	0,5	S	S	64	S	S	4	S	S	4	S	S	0,25	S
	ENF	Mai/09	19	S	8	S	S	8	S	R	64	R	R	64	R	S	0,25	S
	ENF	Mai/09	20	S	4	S	S	64	S	S	1	S	S	8	I	S	0,5	S
	ENF	Mai/09	21	S	4	S	S	4	S	S	4	S	R	64	R	S	0,25	S
	ENF	Out/09	22	S	8	S	S	64	S	S	4	S	S	4	S	S	0,25	S
	ENF	Nov/09	23	S	2	S	S	64	S	S	1	S	S	8	I	S	0,25	S
	CTI	Mar/09	24	S	4	S	S	16	S	S	4	S	S	128	R	S	0,25	S

JXXIII	CTI	Mar/09	25	I	32	R	S	64	S	I	16	S	R	> 512	R	S	0,25	S
	CTI	Abr/09	25	S	16	I	S	8	S	R	32	I	R	64	R	S	0,25	S
	ENF	Abr/09	27	R	16	I	S	2	S	S	32	I	R	64	R	S	0,5	S
	UTQ	Mai/09	28	S	2	S	S	8	S	S	4	S	S	4	S	S	0,5	S
	UTQ	Abr/09	29	S	2	S	S	32	S	R	8	S	R	> 512	R	S	0,5	S
	CGP	Abr/09	30	S	4	S	S	16	S	S	4	S	R	> 512	R	S	0,25	S
	CGP	Mai/09	31	S	1	S	S	16	S	S	4	S	S	4	S	S	2	S
	UTI	Abr/09	32	S	0,5	S	S	16	S	S	4	S	S	2	S	S	0,25	S
	UTQ	Abr/09	33	S	8	S	S	8	S	R	128	R	R	2	S	S	0,25	S
	CTI	Mar/09	34	I	32	R	R	256	R	R	128	R	R	> 512	R	S	0,5	S
	SEC	Abr/09	35	S	1	S	S	16	S	S	4	S	S	2	S	S	0, 25	S
	CTI	Mar/09	36	I	16	I	S	256	R	R	128	R	R	> 512	R	S	4	I
	UTQ	Mai/09	37	R	16	I	S	8	S	R	128	R	R	16	R	S	0,25	S
	SEC	Fev/09	38	S	2	S	S	8	S	R	64	R	R	64	R	S	4	I
	CTI	Mai/09	39	S	16	I	S	16	S	R	32	I	R	32	R	S	0,25	S
	UTQ	Abr/09	40	R	8	S	S	16	S	R	32	I	R	>512	R	S	0,125	S

IMI: Imipenem, MER: Meropenem, CAZ: Ceftazidima, CPM: Cefepime, ATM: Aztreonam, PTZ: Piperacilina /Tazobactam, CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacina,, AMI: Amicacina, GEN: Gentamicina, POL: Polimixina B. Disco-Difusão (DD) e Concentração inibitória mínima (CIM), CM: clínica médica; CTI: centro de terapia intensiva; Enf: enfermarias; Ext: externo; UTQ: unidade de terapia de queimados; UTI: unidade de terapia intensiva; ONC: oncologia; SEC: Serviço de emergência clínica; Conc: concentração; Interp: Interpretação, SP: Hospital Semper; SC: Santa Casa de Misericórdia; OB: Hospital Odilon Behrens; HC: Hospital de Clínicas; JXXIII: Hospital João XXIII

ANEXO Aa

Dados referentes aos setores de origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *A. baumannii* (n=64) recuperadas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte.

HOSPITAL	SETOR	Código amostra	IMI			MERO			CAZ			CPM			CIP			LEV		
			DD	MIC		D D	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC	
				Conc.	Interp.		Con c.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Con c.	Interp.
SP	CTI	1	R	512	R	R	64	R	R	16	I	R	128	R	R	64	R	R	4	I
	CTI	2	R	512	R	R	128	R	R	512	R	R	128	R	R	64	R	R	8	R
	CTI	3	R	512	R	R	32	R	R	64	R	R	128	R	R	256	R	R	8	R
	CTI	4	R	128	R	R	32	R	R	512	R	R	128	R	S	0,5	S	S	0,5	S
	CTI	5	R	128	R	R	64	R	R	>512	R	R	512	R	R	64	R	R	8	R
	CTI	6	R	>512	R	R	128	R	R	> 512	R	R	256	R	S	1	S	S	0,5	S
	CTI	7	R	64	R	R	32	R	R	128	R	R	64	R	R	64	R	R	8	R
	CTI	8	R	64	R	R	32	R	R	512	R	R	256	R	R	256	R	R	16	R
OB	CTI	9	R	128	R	R	32	R	R	128	R	R	128	R	R	256	R	R	8	R
	CC	10	S	8	I	S	2	S	R	512	R	R	64	R	S	0,5	S	S	0,5	S
	CTI	11	R	256	R	R	64	R	R	512	R	R	512	R	R	64	R	R	8	R
	UTI	12	R	128	R	R	32	R	R	512	R	R	512	R	R	256	R	R	8	R
	CTI	13	R	128	R	R	32	R	R	512	R	R	64	R	R	256	R	R	8	R
	CTI	14	R	128	R	R	32	R	R	512	R	R	64	R	R	256	R	R	8	R
	CTI	15	S	4	S	S	0,5	S	S	8	S	S	4	S	S	0,5	S	S	0,5	S
	UTI	16	R	128	R	R	64	R	R	512	R	R	64	R	R	64	R	R	8	R
	CTI	17	R	128	R	R	32	R	R	512	R	R	128	R	R	64	R	R	8	R
	CTI	18	R	256	R	R	32	R	R	512	R	R	512	R	R	64	R	R	8	R
	CTI	19	R	64	R	R	16	R	R	512	R	R	64	R	R	64	R	R	8	R
	CTI	20	S	4	S	S	2	S	R	512	R	R	32	R	R	256	R	S	4	S
	PED	21	S	2	S	S	2	S	R	16	I	R	32	R	R	8	R	R	4	I
	CM	22	R	256	R	R	32	R	R	64	R	R	64	R	R	256	R	R	8	R

Anexo Aa

“Continuação” Dados referentes aos setores de origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *A. baumannii* (n=64) recuperadas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte.

HOSPITAL	SETOR	Código Amostra	AZT			PTZ			AMI			GEN			POL		
			DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC	
				Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.
SP	CTI	1	R	16	R	R	512	R	R	256	R	R	>512	R	S	4	R
	CTI	2	R	64	R	R	>512	R	R	256	R	R	>512	R	S	4	R
	CTI	3	R	32	R	R	>512	R	R	128	R	R	>512	R	S	0,5	S
	CTI	4	R	16	R	R	512	R	S	4	S	S	4	S	S	2	S
	CTI	5	R	16	R	R	>512	R	R	256	R	R	128	R	S	4	R
	CTI	6	R	>64	R	R	512	R	R	128	R	R	512	R	S	4	R
	CTI	7	R	128	R	R	512	R	R	256	R	R	>512	R	S	4	R
	CTI	8	R	64	R	R	>512	R	R	512	R	R	16	R	S	2	S
OB	CTI	9	R	32	R	R	512	R	R	256	R	R	>512	R	S	4	R
	CC	10	R	128	R	R	>512	R	R	256	R	R	>512	R	S	4	R
	CTI	11	R	256	R	R	>512	R	R	64	R	R	256	R	S	4	R
	UTI	12	R	128	R	R	512	R	R	8	S	R	8	I	S	4	R
	CTI	13	R	128	R	R	>512	R	R	256	R	R	>512	R	S	1	S
	CTI	14	R	128	R	R	512	R	R	>512	R	R	16	R	S	4	R
	CTI	15	S	8	S	R	128	R	S	8	S	S	1	S	S	4	R
	UTI	16	R	64	R	R	512	R	R	>512	R	R	512	R	S	4	S
	CTI	17	R	64	R	R	512	R	R	256	R	R	>512	R	S	2	S
	CTI	18	R	256	R	R	512	R	R	256	R	R	>512	R	S	4	R
	CTI	19	R	64	R	R	256	R	S	8	S	S	4	S	S	0,5	S
	CTI	20	R	64	R	R	64	R	S	16	S	S	4	S	S	0,5	S
	PED	21	S	2	S	S	64	S	S	1	S	S	4	S	S	0,3	S
	CM	22	R	128	R	R	512	R	S	8	S	R	16	R	R	8	R

Anexo Aa

“Continuação” Dados referentes aos setores de origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *A. baumannii* (n=64) isoladas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte.

HOSPITAL	SETOR	Código Amostra	IMI			MERO			CAZ			COM			CIP			LEV			AZT		
			DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC	
				Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.
SC	CTI	23	R	128	R	R	64	R	R	256	R	R	128	R	R	64	R	R	4	I	R	64	R
	CTI	24	R	128	R	R	64	R	R	256	R	R	256	R	R	64	R	R	4	I	R	32	R
	CTI	25	R	256	R	R	64	R	R	256	R	R	256	R	R	64	R	R	16	R	R	64	R
	CTI	26	R	512	R	R	64	R	R	512	R	R	64	R	R	16	R	R	4	I	R	64	R
	CTI	27	R	128	R	R	64	R	R	256	R	R	256	R	R	64	R	R	8	R	R	16	R
	CTI	28	R	256	R	R	64	R	R	16	I	S	8	S	R	64	R	R	8	R	R	64	R
	CTI	29	R	128	R	S	64	R	S	512	R	S	512	R	S	64	R	S	8	R	S	8	S
	CTI	30	R	512	R	R	64	R	R	128	R	R	512	R	R	64	R	R	4	I	R	32	R
	CTI	31	R	>512	R	R	256	R	R	512	R	R	64	R	R	256	R	R	8	R	R	32	R
	CTI	32	R	512	R	R	64	R	R	128	R	R	128	R	R	256	R	R	8	R	R	32	R
	CTI	33	R	128	R	R	32	R	R	64	R	R	128	R	R	256	R	R	8	R	R	16	R
	CTI	34	R	64	R	R	32	R	R	512	R	R	512	R	R	64	R	R	8	R	S	8	S
HC	CTI	35	R	128	R	R	32	R	R	16	I	R	16	I	R	64	R	R	8	R	R	64	R
	CTI	36	R	128	R	R	64	R	R	512	R	R	512	R	R	256	R	R	8	R	R	64	R
	CTI	37	R	256	R	R	64	R	R	512	R	R	256	R	R	64	R	R	16	R	R	64	R
	CTI	38	R	128	R	R	64	R	R	512	R	R	128	R	R	32	R	R	8	R	R	64	R
	CTI	39	R	64	R	R	32	R	R	512	R	R	128	R	R	32	R	R	4	I	R	32	R
	CTI	40	R	64	R	R	32	R	R	256	R	R	128	R	R	64	R	R	4	I	R	16	R
	SE	41	R	256	R	R	64	R	R	256	R	R	128	R	R	32	R	R	4	I	R	16	R
	SE	42	R	8	I	I	2	S	R	512	R	R	512	R	R	256	R	R	8	R	R	64	R
	CTI	43	R	64	R	R	32	R	R	512	R	R	512	R	R	256	R	R	8	R	R	64	R
	CTI	44	R	128	R	R	32	R	R	512	R	R	512	R	R	64	R	R	8	R	R	64	R
	CTI	45	R	128	R	R	64	R	R	256	R	R	64	R	S	4	S	S	1	S	S	8	S

Anexo Aa

“Continuação” Dados referentes aos setores de origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *A. baumannii* (n=64) recuperadas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte.

			Código amostras	PTZ			AMI			GEN			POL		
HOSPITAL	SETOR	DATA		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC	
					Conc.	Interp.		Conc.	Interp.						
SC	CTI	mar/09	23	R	512	R	R	512	R	R	512	R	S	0,5	S
	CTI	mar/09	24	R	>512	R	R	128	R	R	512	R	R	>64	R
	CTI	mar/09	25	R	>512	R	R	128	R	R	128	R	S	0,5	S
	CTI	mar/09	26	R	512	R	R	64	R	R	8	I	S	2	S
	CTI	mar/09	27	R	>512	R	R	256	R	R	>512	R	S	1	S
	CTI	abr/09	28	R	32	I	S	2	S	S	1	S	S	0,5	S
	CTI	abr/09	29	S	512	R	S	256	R	S	>512	R	S	4	R
	CTI	mai/09	30	R	>512	R	R	256	R	R	>512	R	S	4	R
	CTI	mar/09	31	R	>512	R	R	512	R	R	64	R	R	4	R
	CTI	mar/09	32	R	256	R	R	32	I	R	16	R	R	8	R
	CTI	mar/09	33	R	512	R	R	512	R	R	>512	R	R	4	R
	CTI	mar/09	34	R	512	R	R	256	R	R	8	I	S	2	S
HC	CTI	mar/09	35	R	32	I	R	32	I	R	8	I	S	2	S
	CTI	mar/09	36	R	>512	R	R	256	R	R	>512	R	R	4	R
	CTI	mar/09	37	R	512	R	S	8	S	S	8	I	S	0,5	S
	CTI	mar/09	38	R	512	R	R	256	R	R	>512	R	R	4	R
	CTI	mar/09	39	R	>512	R	R	256	R	R	>512	R	R	4	R
	CTI	abr/09	40	R	512	R	R	512	R	R	512	R	S	0,3	S
	SE	mai/09	41	R	>512	R	R	128	R	R	>512	R	S	1	S
	SE	mai/09	42	R	128	R	S	256	R	R	>512	R	R	8	R
	CTI	Dez/08	43	R	512	R	S	8	S	R	8	I	S	2	S
	CTI	fev/09	44	R	512	R	R	256	R	S	8	I	R	8	R
	CTI	mai/09	45	R	>512	R	R	64	R	R	64	R	S	0,5	S

Anexo Aa

“Continuação” Dados referentes aos setores de origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *A.baumannii* (n=64) recuperadas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais.

		Código Amostra	IMI			MERO			CAZ			CPM			CIP			LEV			AZT		
HOSPITAL	SETOR		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC	
				Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.		Conc.	Interp.
JXXIII	UTQ	46	R	16	R	S	2	S	R	256	R	R	32	R	R	128	R	R	16	R	R	32	R
	CTI	47	R	64	R	R	32	R	R	256	R	R	256	R	R	32	R	S	4	S	R	16	R
	CTI	48	R	64	I	R	32	R	R	256	R	R	256	R	R	256	R	R	16	R	R	64	R
	CTI	49	R	128	R	R	64	R	R	256	R	R	256	R	R	64	R	R	8	R	R	32	R
	CTI	50	R	64	R	R	32	R	R	128	R	R	512	R	R	256	R	R	8	R	R	64	R
	CTI	51	R	128	R	R	32	R	R	512	R	R	128	R	R	128	R	R	8	R	I	8	S
	ENF	52	R	128	R	R	32	R	R	32	R	R	32	R	R	128	R	R	16	R	R	64	R
	ENF	53	R	64	R	R	32	R	R	128	R	R	512	R	R	256	R	R	8	R	R	64	R
	ENF	54	R	256	R	R	64	R	R	512	R	R	128	R	R	32	R	R	8	R	I	8	S
	ENF	55	R	256	R	R	32	R	R	>512	R	R	128	R	R	256	R	R	8	R	R	>64	R
	UTI	56	R	8	I	S	2	S	R	32	R	R	32	R	R	32	R	R	8	R	R	64	R
	CGP	57	R	128	R	R	32	R	R	512	R	R	64	R	R	64	R	R	8	R	R	64	R
	CGP	58	R	128	R	R	32	R	R	512	R	R	64	R	R	64	R	R	8	R	R	64	R
	CGP	59	R	128	R	R	32	R	R	512	R	R	64	R	R	64	R	R	8	R	R	64	R
	UTI	60	R	128	R	R	32	R	R	512	R	R	32	R	R	64	R	R	8	R	R	64	R
	UTQ	61	R	64	R	R	32	R	R	>512	R	R	128	R	R	64	R	R	8	R	R	>64	R
	SEC	62	R	64	R	R	32	R	R	512	R	R	128	R	R	64	R	R	8	R	R	64	R
	CM	63	R	128	R	R	32	R	R	>512	R	R	128	R	R	64	R	R	8	R	R	64	R
	AMB	64	R	64	R	R	32	R	R	128	R	R	64	R	R	256	R	R	8	R	R	8	S

Anexo Aa

“Continuação” Dados referentes aos setores de origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *A. baumannii* (n=64) recuperadas de

			Código amostras	PTZ			AMI			GEN			POL		
HOSPITAL	SETOR	DATA		DD	MIC		DD	MIC		DD	MIC	Interp.	DD	MIC	Interp.
					Conc.	Interp.		Conc.	Interp.					Conc.	Interp.
JXXIII	UTQ	mai/09	46	S	64	S	R	64	R	R	256	R	S	0,3	S
	CTI	fev/09	47	R	512	R	R	512	R	R	512	R	S	0,5	S
	CTI	fev/09	48	R	512	R	S	512	R	R	512	R	R	>64	R
	CTI	mai/09	49	R	>512	R	R	256	R	S	>512	R	S	0,3	S
	CTI	mar/09	50	S	512	R	R	1	S	R	32	R	S	0,5	S
	CTI	mar/09	51	R	512	R	S	64	R	S	>512	R	S	0,5	S
	ENF	abr/09	52	R	512	R	R	64	R	R	32	R	S	0,5	S
	ENF	abr/09	53	R	512	R	R	128	R	R	32	R	S	0,5	S
	ENF	abr/09	54	R	512	R	S	128	R	R	>512	R	S	0,5	S
	ENF	abr/09	55	R	512	R	R	32	I	R	>512	R	S	0,5	S
	UTI	abr/09	56	R	512	R	S	1	S	S	2	S	S	0,5	S
	CGP	abr/09	57	R	512	R	R	64	R	S	4	S	S	0,5	S
	CGP	abr/09	58	R	512	R	R	64	R	S	4	S	S	0,5	S
	CGP	abr/09	59	R	512	R	R	64	R	R	>512	R	S	0,5	S
	UTI	mai/09	60	R	512	R	R	64	R	R	>512	R	S	0,5	S
	UTQ	abr/09	61	R	512	R	S	2	S	R	8	I	S	0,5	S
	SEC	abr/09	62	S	512	R	R	128	R	R	8	I	S	0,5	S
	CM	abr/09	63	R	517	R	S	128	R	R	>512	R	S	0,5	S
	AMB	dez/08	64	R	512	R	S	1	S	S	1	S	S	0,5	S

hemoculturas de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte.

ANEXO B

Dados referentes aos testes fenotípicos de Metallo-β-lactamases (MBL) e β-lactamases de espectro ampliado (ESBL) de amostras de *P. aeruginosa* isolados de hemocultura em Belo Horizonte

MPA: ácido 2-mecaptopropiônico, MAA: ácido 2-mercaptopacético, EDTA: ácido etilenodiaminotetracético, CAZ: Ceftazidime, IMP: imipenem

Hospital	Código Amostra	Testes fenotípicos de MBL e ESBL									
		MPA+IMI	MAA+IMI	EDTA+IMI	MPA+CAZ	MAA+CAZ	EDTA+CAZ	Etest	TMH	AmpC	OXA
SP	1	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC	4	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
	5	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
	8	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	10	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
OB	13	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
HC	17	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	19	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JXXII	24	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	25	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	29	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	31	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	33	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	34	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	37	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	39	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) teste positivo (-) teste negativo, SP:Hospital Semper, HC:Hospital das Clínicas, OB:Odilon Behrens, SC: Santa Casa de Misericórdia, JXXII: Hospital João XXIII, TMH:Teste de Hodge Modificado, Etest: *epsilometer test*, AmpC: cefalosporinase, Oxa: Oxacilinase.

ANEXO Ba

Dados referentes aos testes fenotípicos de Metallo- β -Lactamases (MBL) e β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) de amostras de *A. baumannii* isoladas de hemocultura em Belo Horizonte.

Hospital	Código Amostra	Testes fenotípicos									
		MBL								ESBL	
		MPA+IMI	MAA+IMI	EDTA+IMI	MPA+CAZ	MAA+CAZ	EDTA+CAZ	Etest	THM	AmpC	oxa
SP	1	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
	2	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
	3	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	4	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	5	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	7	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	8	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
OB	9	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
	10	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
	11	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	12	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	13	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	15	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	16	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
	17	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	18	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
	19	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	20	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	21	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
SC	22	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	23	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	24	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	25	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	26	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	27	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	29	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	30	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	31	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	32	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	33	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

MPA: ácido 2-mecaptopropiônico, MAA: ácido 2-mercaptoacético, EDTA: ácido etilenodiaminotetracético, CAZ: Cefazidime, IMP: imipenem (+) teste positivo (-) teste negativo, SP:Hospital Semper, HC:Hospital das Clínicas, OB:Odilon Behrens, SC: Santa Casa de Misericórdia, JXXIII: Hospital João XXIII, TMH:Teste de Hodge Modificado, Etest: *epsilometer test*, AmpC: cefalosporinase, Oxa: Oxacilina.

ANEXO Ba

Dados referentes aos testes fenotípicos de Metallo- β -Lactamases (MBL) e β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) de amostras de *A. baumannii* isoladas de hemocultura em Belo Horizonte.

Hospital	Código Amostra	Testes fenotípicos de MBL e ESBL									
		MPA+IMI	MAA+IMI	EDTA+IMI	MPA+CAZ	MAA+CAZ	EDTA+CAZ	Etest	THM	AmpC	Oxa
	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HC	35	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	36	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	37	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	38	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	39	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	40	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	41	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	42	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	43	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	44	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	45	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
	46	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	47	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	48	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	49	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
JXXIII	50	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	51	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	52	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	53	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	54	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
	55	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	56	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	57	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	58	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	59	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	60	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	61	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	62	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	63	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	64	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-

MPA: ácido 2-mecaptopropiônico, MAA: ácido 2-mercaptoacético, EDTA: ácido etilenodiaminotetracético, CAZ: Ceftazidime, IMP: imipenem (+) teste positivo (-) teste negativo, SP: Hospital Semper, HC: Hospital das Clínicas, OB: Odilon Behrens, SC: Santa Casa de Misericórdia, JXXIII: Hospital João XXIII, TMH: Teste de Hodge Modificado, Etest: *epsilometer test*, AmpC: cefalosporinase, Oxa: Oxacilinase.

ANEXO C

Dados referentes aos testes genotípicos de detecção de β -lactamases amostras de *P. aeruginosa* isoladas de hemocultura de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte

Hospital	Código Amostras	PCR (Genes pesquisados)									
		<i>bla</i> _{SPM-1}	<i>bla</i> _{SIM-1}	<i>bla</i> _{VIM-1}	<i>bla</i> _{IMP-1}	<i>bla</i> _{GIM-1}	<i>bla</i> _{AmpC}	<i>bla</i> _{Oxa-23}	<i>bla</i> _{Oxa-24}	<i>bla</i> _{Oxa-51}	<i>bla</i> _{Oxa-58}
SP	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC	4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OB	13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HC	17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JXXII	24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	27	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	29	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	31	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	32	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Código amostra	blaSPM-1	blaSIM-1	blaVIM-1	blaIMP-1	blaGIM-1	blaAmpC	blaOxa-23	blaOxa-24	blaOxa-51	blaOxa-58
	33	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	35	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	38	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	39	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

SEMPER: Serviço Médico permanente, HC: Hospital das clínicas, OB: Odilon Behrens, SC: Santa casa, JXXIII: Hospital João XXIII, + (positivo)
- (Negativo).

ANEXO Ca

Dados referentes aos testes genotípicos de detecção de β -lactamases das amostras de *A. baumannii* isoladas de hemocultura de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte.

Hospital	Código Amostras	PCR									
		<i>bla</i> _{SPM-1}	<i>bla</i> _{SIM-1}	<i>bla</i> _{VIM-1}	<i>bla</i> _{IMP-1}	<i>bla</i> _{GIM-1}	<i>bla</i> _{AmpC}	<i>bla</i> _{Oxa-23}	<i>bla</i> _{Oxa-24}	<i>bla</i> _{Oxa-58}	
SP	1	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
	2	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	4	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	5	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	6	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	7	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	8	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
OB	9	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	10	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	11	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	12	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
	13	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	14	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	15	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	16	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	17	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	18	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	19	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	20	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
	21	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
SC	22	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	23	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
	24	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	25	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	26	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	27	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	28	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
	29	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	30	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	31	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	32	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	33	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+

SEMPER: Serviço Médico permanente, HC: Hospital das clínicas, OB: Odilon behrens, SC: Santa casa, JXXIII: Hospital João XXIII, + (positivo) - (Negativo)

Anexo Ca - “ Continuação” Dados referentes ao teste genotípicos de β -lactamases amostras de *A. baumannii* isoladas de hemocultura de pacientes internados em hospitais de Belo Horizonte.

Hospital	Código Amostras	PCR (Genes pesquisados)									<i>bla</i> _{Oxa-51}
		<i>bla</i> _{SPM-1}	<i>bla</i> _{SIM-1}	<i>bla</i> _{VIM-1}	<i>bla</i> _{IMP-1}	<i>bla</i> _{GIM-1}	<i>bla</i> _{AmpC}	<i>bla</i> _{Oxa-23}	<i>bla</i> _{Oxa-24}	<i>bla</i> _{Oxa-58}	
HC	34	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	35	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	36	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	37	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	38	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	39	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	40	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	41	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	42	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	43	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	44	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	45	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	46	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
	47	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	48	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
JXXIII	49	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	50	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	51	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	52	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	53	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	54	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	55	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
	56	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	57	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	58	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	59	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	60	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	61	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	62	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	63	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	64	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+

Legenda:. SEMPER: Serviço Médico permanente, HC: Hospital das clínicas, OB: Odilon Behrens, SC: Santa casa, JXXIII: Hospital João XXIII, + (positivo) - (Negativo)

Anexo D

Dados referentes à Concentração inibitória mínima (CIM) e Detecção fenotípica e genotípica de MβL amostras de *P. aeruginosa* isoladas de hemocultura de pacientes internados em hospitais de Belo Horizonte no período de dezembro de 2008 a junho de 2009.

Cod. Amostra	Hospital	MIC (µg/mL)											Detecção de MβL			
		Antimicrobianos											Fenotípico			Genotípico
		IMP	MER	CAZ	CPM	CIP	LEV	AZT	PPT	AMI	GEN	POL	DA	ETEST	THM	Gene
1	SP	256	64	>512	>512	8	16	8	256	> 512	64	0,25	+	+	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
2		4	2	128	128	64	32	4	64	32	1	1	-	-	-	-
3		4	0,5	2	2	0,125	0,5	8	8	8	1	0,25	-	-	-	-
4	SC	32	8	128	128	128	128	32	32	8	> 512	0,5	+	+		<i>bla</i> _{SPM-1}
5		>512	128	64	64	128	128	32	512	4	4	0,5	+	+	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
6		2	0,5	1	4	0,125	0,5	2	4	8	4	0,5	+	+	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
7		>512	128	>512	>512	128	128	32	512	8	> 512	0,5	+	+	+	<i>bla</i> _{SPM-1}
8		8	8	8	8	0,25	0,5	32	16	8	> 512	0,125	+	+	-	<i>bla</i> _{SPM-1/VIM-1}
9		2	0,5	2	2	0,125	0,5	4	64	8	2	0,125	-	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
10		64	16	64	32	8	8	512	64	32	8	0,25	-	+	-	<i>bla</i> _{SPM-1/VIM-1}
11		4	0,5	32	4	4	4	2	8	4	2	0,25	-	—	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
12		2	1	8	4	0,125	1	1	8	4	128	2	-	—	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
13	OB	32	16	64	32	32	16	32	64	8	4	0,25	+	—	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
14		2	1	2	4	4	0,5	8	16	4	> 512	0,25	-	—	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
15		2	2	2	2	0,125	0,5	8	8	1	2	0,25	-	—	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
16		2	4	4	8	0,125	0,5	8	16	1	4	0,25	-	—	-	<i>bla</i> _{SPM-1/VIM-1}
17	HC	2	2	8	8	0,125	0,5	4	64	4	> 512	0,25	-	—	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
18		4	0,5	64	64	32	1	0,5	64	4	4	0,25	-	—	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
19		32	16	64	64	8	16	8	8	64	64	0,25	+	+	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
20		4	0,5	8	4	0,125	0,5	4	64	1	8	0,5	-	-	-	-
21		2	0,5	2	8	0,125	0,5	4	4	4	64	0,25	-	-	-	-
22		2	1	1	1	0,125	0,5	8	64	4	4	0,25	-	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
23		4	0,5	8	2	0,125	1	2	64	1	8	0,25	-	-	-	-

Anexo D - “Continuação” Dados referentes à Concentração inibitória mínima (CIM) e Detecção fenotípica e genotípica de MβL amostras de *P. aeruginosa* isoladas de hemocultura de pacientes internados em hospitais de Belo Horizonte no período de dezembro de 2008 a junho de 2009.

Cod. Amostra	Hospital	MIC (µg/mL)											Detecção de MβL			
		Antimicrobianos											Fenotípico			Genotípico
		IMP	MER	CAZ	CPM	CIP	LEV	AZT	PPT	AMI	GEN	POL	DA	ETEST	THM	Gene
24	JXXIII	64	16	2	4	0,125	0,5	4	16	4	128	0,25	P	+	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
25		64	16	128	> 512	0,125	0,5	32	64	16	> 512	0,25	N	+	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
25		64	16	128	> 512	4	0,5	16	8	32	64	0,25	N	+	-	<i>bla</i> _{SPM-1/VIM-1}
27		4	4	64	>512	16	32	16	2	32	64	0,5	N	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
28		2	2	4	4	2	2	2	8	4	4	0,5	N	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
29		64	16	64	2	16	32	2	32	8	> 512	0,5	P	+	-	<i>bla</i> _{SPM-1/VIM-1}
30		2	0,5	4	1	0,125	0,25	4	16	4	> 512	0,25	N	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
31		32	16	1	4	0,125	0,25	1	16	4	4	2	N	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
32		4	4	8	4	8	4	0,5	16	4	2	0,25	N	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
33		32	16	32	32	32	16	8	8	128	2	0,25	P	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
34		32	16	16	32	32	32	32	256	128	> 512	0,5	P	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1/VIM-1}
35		4	0,5	2	2	0,125	0,5	1	16	4	2	0,25	N	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
36		64	32	16	32	32	32	16	256	128	> 512	4	N	+	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
37		16	16	16	32	32	16	16	8	128	16	0,25	P	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
38		2	1	>512	>512	16	4	2	8	64	64	4	N	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
39		16	16	4	32	4	32	16	16	32	32	0,25	N	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}
40		2	1	2	4	0,125	0,125	8	16	32	>512	0,125	N	-	-	<i>bla</i> _{SPM-1}

ANEXO Da

Dados referentes à concentração inibitória mínima (CIM) e detecção fenotípica e genotípica de MBL das 64 amostras de *A. baumannii* isoladas de hemocultura de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte.

HOSPITAL	SECTOR	DATA	Cod. Amostra	MIC (µg/mL)											Detecção de MBL + ESBL				
				Antimicrobianos											Fenotípico				Genotípico
				IMI	MER	CAZ	CPM	CIP	LEV	AZT	PPT	AMI	GEN	POL	DA	ETEST	THM	ESBL	GENE
SP	CTI	dez/08	1098	512	64	16	128	64	4	16	512	256	>512	4	+	+	-	+	<i>bla</i> _{Ampc/Oxa23/Oxa51}
	CTI	dez/08	1180	512	128	512	128	64	8	64	>512	256	>512	4	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa23/Oxa51}
	CTI	dez/08	1015	512	32	64	128	256	8	32	>512	128	>512	0,5	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Oxa23/Oxa51}
	CTI	out/08	2002	128	32	512	128	0,5	0,5	2	512	4	4	2	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa23/Oxa51}
	CTI	out/08	2006	128	64	>512	512	64	8	16	>512	256	128	4	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Oxa23/Oxa51}
	CTI	nov/08	2036	>512	128	> 512	256	1	0,5	>64	512	128	512	4	+	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM-1/Oxa23/Oxa51}
	CTI	jan/09	1110	64	32	128	64	64	8	128	512	256	>512	4	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Oxa23/Oxa51}
	CTI	fev/09	1068	64	32	512	256	256	16	64	>512	512	16	2	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa51}
OB	CTI	fev/09	5778	128	32	128	128	256	8	32	512	256	>512	4	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa23/Oxa51}
	CTI	fev/09	5922	256	64	512	512	64	8	256	>512	64	256	4	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa23/Oxa51}
	UTI	mar/09	6161	128	32	512	512	256	8	128	512	8	8	4	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa23/Oxa51}
	CTI	abr/09	6497	128	32	512	64	256	8	128	>512	256	>512	1	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa23}
	CTI	abr/09	6599	128	32	512	64	256	8	128	512	>512	16	4	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa23}
	CTI	abr/09	6612	4	0,5	8	4	0,5	0,5	8	128	8	1	4	-	-	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa23}
	UTI	abr/09	6767	128	64	512	64	64	8	64	512	>512	512	4	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa23/Oxa51}
	CTI	abr/09	6775	128	32	512	128	64	8	64	512	256	>512	2	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa23/Oxa51}
	CTI	abr/09	6824	256	32	512	512	64	8	256	512	256	>512	4	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa23/Oxa51}
	CTI	abr/09	5935	64	16	512	64	64	8	64	256	8	4	0,5	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc}
	CTI	abr/09	7062	4	2	512	32	256	4	64	64	16	4	0,5	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc}
	CM	mai/09	7024	256	32	64	64	256	8	128	512	8	16	8	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Ampc/Oxa23}

Anexo Da - “Continuação” Dados referentes à concentração inibitória mínima (CIM) e detecção fenotípica e genotípica de MBL das 64 amostras de *A. baumannii* isoladas de hemocultura de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte.

HOSPITAL	SECTOR	DATA	Cod. Amostra	MIC (µg/mL)											Detecção de MBL + ESBL				
				Antimicrobianos											Fenotípico				Genotípico
				IMI	MER	CAZ	CPM	CIP	LEV	AZT	PPT	AMI	GEN	POL	DA	ETEST	THM	ESBL	GENE
SC	CTI	mar/09	4442	128	64	256	128	64	4	64	512	512	512	0,5	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	mar/09	4471	128	64	256	256	64	4	32	>512	128	512	>64	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	mar/09	4740	256	64	256	256	64	16	64	>512	128	128	0,5	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Oxa51}
	CTI	mar/09	4855	512	64	512	64	16	4	64	512	64	8	2	-	+	-	+	<i>bla</i> _{Oxa23/Oxa51}
	CTI	mar/09	4712	128	64	256	256	64	8	16	>512	256	>512	1	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	abr/09	6351 1º	256	64	16	8	64	8	64	32	2	1	0,5	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	abr/09	6415	128	64	512	512	64	8	8	512	256	>512	4	-	-	-	+	<i>AmpC/Oxa23/Oxa51</i>
	CTI	mai/09	6484	512	64	128	512	64	4	32	>512	256	>512	4	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	mar/09	4323	>512	256	512	64	256	8	32	>512	512	64	4	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC}
	CTI	mar/09	4266	512	64	128	128	256	8	32	256	32	16	8	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	mar/09	4139	128	32	64	128	256	8	16	512	512	>512	4	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23}
	CTI	mar/09	4571	64	32	512	512	64	8	8	512	256	8	2	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Oxa23/Oxa51}
HC	CTI	mar/09	4588	128	32	16	16	64	8	64	32	32	8	2	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	mar/09	4670	128	64	512	512	256	8	64	>512	256	>512	4	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	mar/09	4884	256	64	512	256	64	16	64	512	8	8	0,5	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	mar/09	164 J	128	64	512	128	32	8	64	512	256	>512	4	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23}
	CTI	mar/09	299 J	64	32	512	128	32	4	32	>512	256	>512	4	-	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM-1/Oxa23/Oxa51}
	CTI	abr/09	841	64	32	256	128	64	4	16	512	512	512	0,25	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	SE	mai/09	21 M	256	64	256	128	32	4	16	>512	128	>512	1	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	SE	mai/09	96 M	8	2	512	512	256	8	64	128	256	>512	8	+	+	-	+	<i>VIM-1/AmpC/Oxa23</i>
	CTI	dez/08	671 J	64	32	512	512	256	8	64	512	8	8	2	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	fev/09	867	128	32	512	512	64	8	64	512	256	8	8	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	mai/09	479 M	128	64	256	64	4	1	8	>512	64	64	0,5	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}

Anexo Da - “Continuação” Dados referentes à concentração inibitória mínima (CIM) e detecção fenotípica e genotípica de MBL das 64 amostras de *A. baumannii* isoladas de hemocultura de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte.

HOSPITAL	SECTOR	DATA	Cod. Amostra	MIC (µg/mL)											Detecção de MBL + ESBL				
				Antimicrobianos											Fenotípico				Genotípico
				IMI	MER	CAZ	CPM	CIP	LEV	AZT	PPT	AMI	GEN	POL	DA	ETEST	THM	ESBL	GENE
JXXIII	CTI	fev/09	162	64	32	256	128	256	16	64	512	512	32	0,5	+	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23}
	CTI	fev/09	294	64	32	256	256	32	4	16	512	512	512	0,5	+	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	fev/09	283	64	32	256	256	256	16	64	512	512	512	>64	-	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	mai/09	100 A	128	64	256	256	64	8	32	>512	256	>512	0,25	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	mar/09	143 A	64	32	128	512	256	8	64	512	1	32	0,5	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CTI	mar/09	108	128	32	512	128	128	8	8	512	64	>512	0,5	-	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM-1/Oxa23/Oxa51}
	ENF	abr/09	238 B	128	32	32	32	128	16	64	512	64	32	0,5	+	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	ENF	abr/09	356 A	64	32	128	512	256	8	64	512	128	32	0,5	-	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	ENF	abr/09	363 A	256	64	512	128	32	8	8	512	128	>512	0,5	+	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	ENF	abr/09	7	256	32	>512	128	256	8	>64	512	32	>512	0,5	-	+	-	-	<i>bla</i> _{AmpC/Oxa23/Oxa51}
	UTI	abr/09	350 A	8	2	32	32	32	8	64	512	1	2	0,5	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/Oxa23/Oxa51}
	CGP	abr/09	082 A	128	32	512	64	64	8	64	512	64	4	0,5	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CGP	abr/09	62	128	32	512	64	64	8	64	512	64	4	0,5	-	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CGP	abr/09	309	128	32	512	64	64	8	64	512	64	>512	0,5	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	UTI	mai/09	204	128	32	512	32	64	8	64	512	64	>512	0,5	-	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	UTQ	abr/09	027 B	64	32	>512	128	64	8	>64	512	2	8	0,5	-	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	SEC	abr/09	405	64	32	512	128	64	8	64	512	128	8	0,5	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	CM	abr/09	397	128	32	>512	128	64	8	64	517	128	>512	0,5	-	+	-	+	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	AMB	dez/08	167	64	32	128	64	256	8	8	512	1	1	0,5	+	+	-	-	<i>bla</i> _{VIM-1/AmpC/Oxa23/Oxa51}
	ENF	UTQ	mai/09	16	2	256	32	128	16	32	64	64	256	0,25	-	-	-	-	<i>bla</i> _{Oxa23/Oxa51}

ANEXO E

Fotos da reação em cadeia da polimerase exemplificando algumas amostras produtoras dos genes *bla_{SPM-1}*, *bla_{VIM-1}*, *bla_{AmpC}*, *bla_{OXA23}*, *bla_{OXA51}*.

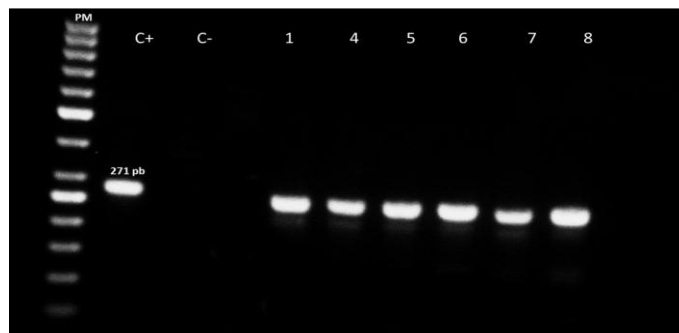


FIGURA 13 - Detecção do genes *bla_{SPM-1}* (271 pb) na amostra 1,4, 5, 6, 7, 8 em isolados de *P. aeruginosa*. PM: padrão molecular (50 pb) C+ (controle positivo) C- (controle negativo).

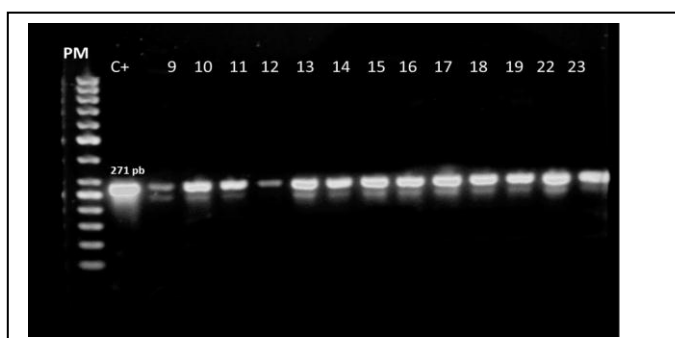


FIGURA 14 - Detecção do gene *bla_{SPM-1}* (271 pb) na amostra 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 11, 23 em isolados de *P. aeruginosa* , PM: padrão molecular (50 pb) C+ (controle positivo) C- (controle negativo).

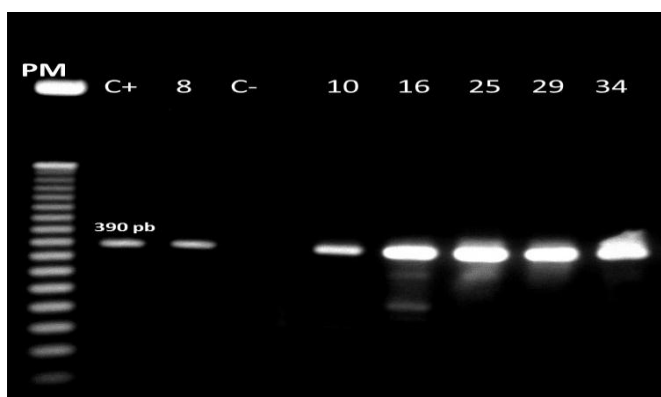


FIGURA 15 - detecção do genes *bla_{VIM-1}* (390 pb) na amostra 8, 10,16, 25, 29, 34 em amostras de *P. aeruginosa*. PM: padrão molecular.

ANEXO E “Continuação” Fotos da reação em cadeia da polimerase exemplificando algumas amostras produtoras dos genes *bla_{SPM-1}*, *bla_{VIM-1}*, *bla_{AmpC}*, *bla_{OXA23}*, *bla_{OXA51}*.



FIGURA 16 - detecção do gene *bla_{VIM-1}* (390 pb) na amostra 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 em isolados de *A. baumannii*. PM: padrão molecular.

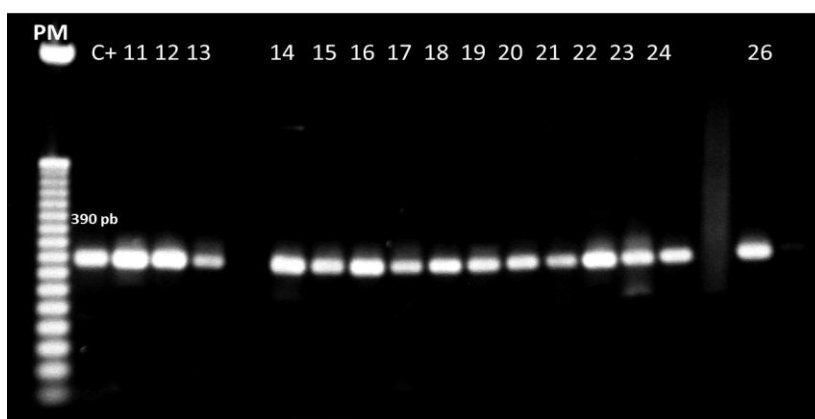


FIGURA 17 - detecção do gene *bla_{VIM-1}* (390 pb) na amostra 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 26 em isolados de *A. baumannii*. PM: padrão molecular.

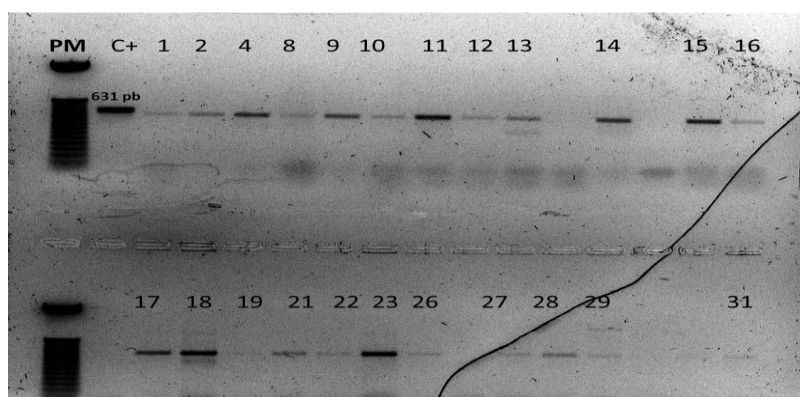


FIGURA 18 - detecção do gene *bla_{AmpC}* (631 pb) na amostra 1, 2, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 26, 27, 28, 29, 31 de isolados de *A. baumannii*. PM: padrão molecular.

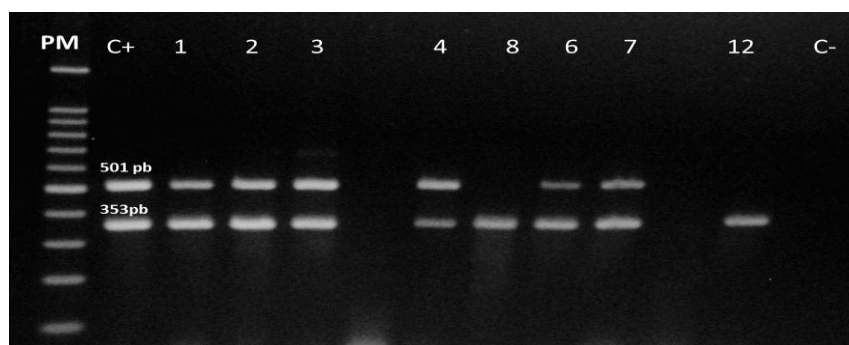


FIGURA 19 - detecção do genes *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA51} (501 pb e 353 pb) na amostra 1, 2, 3, 4, 8, 6, 7, 12, de isolados de *A. baumannii*. PM: padrão molecular.

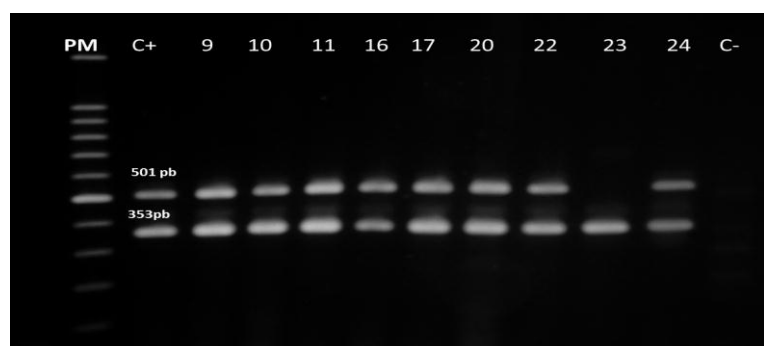


Figura 20 - detecção do genes *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA51} (501 pb e 353 pb) na amostra 9, 10, 11, 16, 17, 20, 22, 23, 24 de isolados de *A. baumannii*. PM: padrão molecular.



FIGURA 21 - detecção do gene *bla*_{OXA23} (501 pb) na amostra 12, 13, 14, 15, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 32 em isolados de *A. baumannii*. PM: padrão molecular.

ANEXO F

Tabela com o tamanho dos fragmentos obtidos por RAPD utilizados para a construção do dendograma para amostras de *P. aeruginosa* GRAF. 10)

Amostra	Tamanho molecular em pares de base dos fragmentos obtidos por RAPD							
MG01	150	165	195	280	330			
MG02	165	195	280	330	450			
MG03	165	195	280	330				
MG04	165	195	280	330				
MG05	165	195	280	330	900			
MG06	165	195	280	330	450	780		
MG07	165	195	280	330				
MG08	165	195	280	330	450			
MG09	150	165	195	280	330	550		
MG10	165	195	280	450				
MG11	165	195	280	330	450			
MG12	165	195	230	260	400	550		
MG13	150	165	195	280	330			
MG14	150	165	195	280	330			
MG15	165	195	280					
MG16	165	195	280	330	380	400	480	
MG17	380	500	630	900	1200			
MG18	165	195	280					
MG19	165	195	280	330	500			
MG20	165	195	280	330	500	550		
MG21	165	195	280	500	550			
MG22	165	195	280	500				
MG23	165	195	280	330	380	480		
MG24	165	195	280					
MG25	165	280	300	330	500	600		
MG26	165	195	280					
MG27	165	195	280					
MG29	380	500	630	900	1200			
MG30	165	195	280	330	480	700		
MG31	165	260	290	330	700			
MG32	165	195	280	330	500			
MG33	165	195	280	330	500			
MG34	165	195	280	500	700			
MG35	165	195	250	280	330	500		
MG36	165	195	280	480	500	600		
MG37	165	195	280	480	500	800	900	
MG38	165	195	280	500	900			
MG39	165	195	280					
MG40	165	195	280	500				
MG41	165	195	280	330	400	600		
MG42	165	195	280	330	400	600		

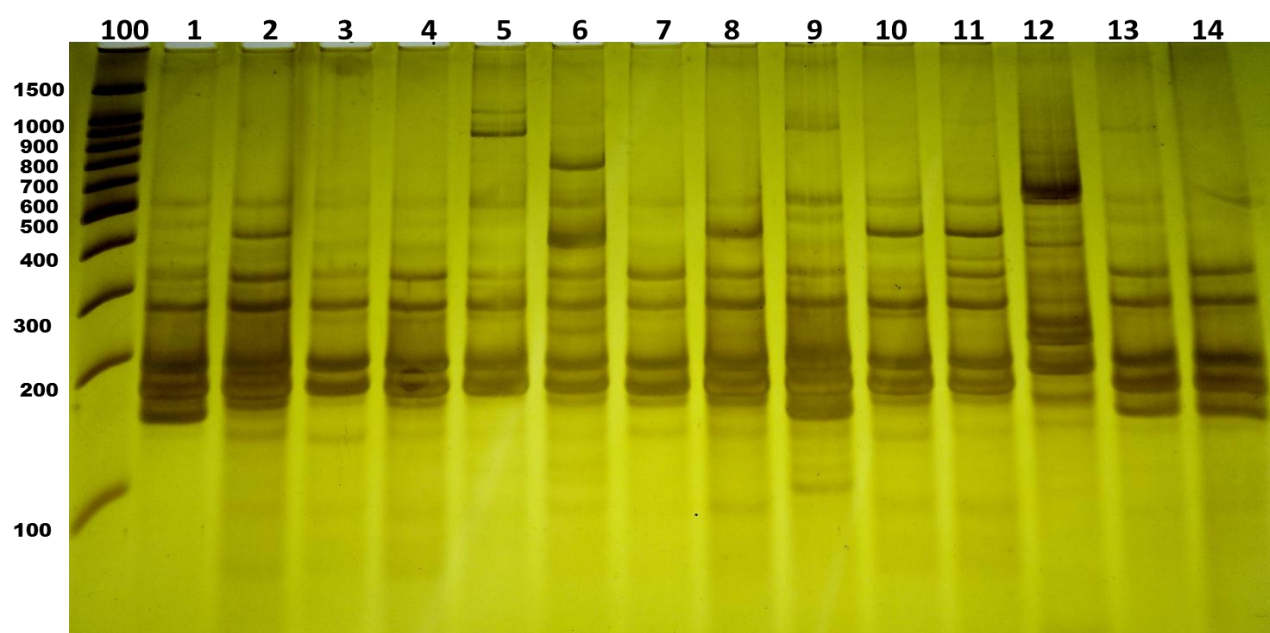


FIGURA 22 – Gel de RAPD de amostras de *P. aeruginosa* PM: padrão molecular.

ANEXO G Tabela com o tamanho dos fragmentos obtidos por ERIC utilizados para a construção do dendograma para amostras de *P.aeruginosa* (GRAF. 11)

		SP	SC										OB				HC				JXXIII
PM	c+	1	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	22	24	
1500																		1200			
						1200															
1000						1000	1000											1000	1000		
900							900						900		900				900		
800																					
700																		700			
600													600								
	510	510	510	510	510	510	510	510	510	510			510				510				
500											500										
	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	500			
																		450	410	490	
	450	450	450		450				410	450	400	400	400					400	400	400	
400																					
				320		320	320	350	350	350	350				300	300	300		390		
300	300	300	300	300	300	300	300		300	300	300	300		310	290						
	290	290	290	290	290	290	290			290	290	250	250	250	250	250	250	250	250	300	
200				210		210	210									200	200	200	200	200	
	150	150	150	150	150		150	150	150	150	150	150	150	150	150		150	150	150		
100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

“CONTINUAÇÃO” Tabela com o tamanho dos fragmentos obtidos por ERIC utilizados para a construção do dendograma para amostras de *P.aeruginosa* (GRAF. 11)

PM	JXXIII															
1500	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1000						1000										
900												900				900
800																
700			700		700	700	700		700	700						
600																
	510					510		510	510	510	510				510	
500			500				550				500	500	500	500	500	500
	490			490	490			490								
						450	450		450	450						
400		390	400			400	400		400	400	390	400				400
	350	350	310													
300		300	300					300			300	300	300	300	300	300
	290		250	290	300			250	290			210		210		
200		200	200		200			200	200	200	200			200		200
		150	150		150	150	150		150	150						
100				100			100	100	100	100	100	100	100	100		

ANEXO Ga

Tabela com tamanho dos fragmentos obtidos por ERIC utilizados para a construção do dendograma para amostras de *A. baumannii* (GRAF. 10)

		SP							OB							
PM	C+	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	15	16	17	20	21
1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
																950
900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900
800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800
700	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700
600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
						590		590	590						590	
500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
								490								
400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
								380								
300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
				250				250								
200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
100	100		100	100				100		100	100	100	100	100		
	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70		70	70	70

ANEXO Ga

"Continuação "Tabela com tamanho dos fragmentos obtidos por ERIC utilizados para a construção do dendograma para amostras de *A. baumannii* (GRAF. 10)

		SC											HC									
PM	C+	22	23	24	25	26	27	28	29	30	32	33	34	35	36	37	39	40	41	43	44	45
1500	1500			1500		1500				1500	1500	1500		1500		1500	1500		1500			
														1200	1200		1200	1200		1200	1200	1200
1000	1000		1000	1000	1000	1000				1000	1000	1000										
900	900		900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900	900		900	900	900	900	900	900
800	800		800	800	800	800				800	800	800										
700	700			700		700	700		700	700	700	700	700	700	700		700	700		700	700	700
600	600			600		600	600	600	600	600	600	600										
500	500	500					500		500													
		450																				
400	400																					
300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
		250		250		250	250	250	250	250	250	250	250	250		250	250	250	250	250	250	250

ANEXO Ga

“Continuação “Tabela com tamanho dos fragmentos obtidos por ERIC utilizados para a construção do dendograma para amostras de *A. baumannii* (GRAF. 10)

JXXIII																			
PM	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
1500		1500	1500		1500			1500	1500		1500		1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
					1200		1200			1200	1200								
1000																			
							950	950	950	950	950	950	950	950	950		950		950
900	900	900	900	900		900													
	850				850	850	850	850	850	850	850						850		
800		800																	
700		700					700			700	700						700	700	700
600	600	600		600	600		600				600	600	600	600	600	600			
							550				550	550	500	500	500	500	550	550	
500	500																		
		450		450															
400																			
300		300					300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
		250																	
200	200	200	200	200	200	200	200	200	200		200	200			200	200	200	200	
100	100	100	100	100	100														

