

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

FRANCELLI APARECIDA CORDEIRO NEVES

Características microbiológicas de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes ao imipenem isoladas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva, e descrição clínico-epidemiológica dos portadores

**Belo Horizonte
2012**

FRANCELLI APARECIDA CORDEIRO NEVES

Características microbiológicas de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes ao imipenem isoladas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva, e descrição clínico-epidemiológica dos portadores

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Vandack Alencar Nobre Junior

Co-orientadora: Profa. Wanessa Trindade Clemente

Belo Horizonte

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Prof. Clélio Campolina Diniz

PRO-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ricardo Santiago Gomes

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Renato de Lima Santos

DRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Francisco José Penna

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Profa. Anaelise Impeliziere Nogueira

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Vandack Alencar Nobre Junior (Coordenador)

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha (Sub-coordenador)

Prof. Antonio Luiz Pinho Ribeiro

Profa. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Junior

Antônio Vaz de Macedo (Discente Titular)

À Maria Eduarda e Felipe,
Dedico este trabalho e todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** sobre todas as coisas, que me amparou em todos os momentos difíceis, deu-me a força necessária para superar todas as dificuldades, permitindo assim, a finalização desta tão importante tarefa.

Pela inspiração, pela motivação e por me guiarem nessa difícil empreitada, agradeço aos meus orientadores, **Prof. Vandack Nobre** e **Profa. Wanessa Clemente**. Compartilho com vocês toda a minha felicidade e agradeço, profundamente, a confiança e oportunidade de trabalhar com vocês.

Pelo conhecimento em uma área específica, na qual pouco sabia e pela a execução dos testes laboratoriais, sem os quais este trabalho não seria viável, agradeço ao **Prof. Nilton Lincopan**.

Pelas contribuições, apoio e a intervenções pontuais, além da genialidade que todos que convivem com você aprendem a reconhecer, agradeço ao **Paulo Mourão**.

Pela contribuição fundamental no armazenamento, congelamento e interface com o laboratório de microbiologia, agradeço à **Luciene França**.

Pela disponibilidade e apoio em momentos decisivos, agradeço à **Stella Salla** e **Roberta Romanelli**.

Pelo apoio na execução deste trabalho e pelo “colo” nos momentos difíceis, agradeço à **Lenize** e **Letícia**.

Pela oportunidade de hoje estar aqui e pelo exemplo de vida e caráter, agradeço aos **meus pais**.

Simplesmente, por existirem em minha vida, agradeço ao meu marido, **Felipe**, e a minha linda princesa “**Duda**”.

Aos meus irmãos – **Fernanda, Franco, Francymar e Beto** – meus amigos. Pela existência em minha vida e amizade verdadeira.

À **Erica**, pela atenção e todo o cuidado dispensado a mim e minha filha.

Por fim, sou grata ao meu grupo de trabalho (CCIH/HC-UFMG) cujas aptidões especiais e generosidade foram de grande auxílio, já que muitas modificações foram resultado de nossas conversas e sem as quais a qualidade final desse estudo não seria a mesma.

“The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant.” (Alexander Fleming)

RESUMO

Considerando-se a crescente frequência do isolamento de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB) e a sua relevância clínico-epidemiológica, torna-se necessário um melhor conhecimento do perfil de susceptibilidade desse patógeno, visando estabelecer alternativas aos esquemas convencionais de tratamento, elucidar mecanismos de resistência e compreender a disseminação dessas cepas no ambiente hospitalar. Na última década, com o avanço das técnicas moleculares, houve maior entendimento do fenômeno de aquisição de resistência e da sua distribuição clonal. Esse estudo teve como objetivo o de avaliar mecanismos enzimáticos envolvidos na resistência aos carbapenêmicos e o padrão de similaridade gênica de cepas CRAB oriundas de pacientes internados em uma Unidade de Terapia Intensiva, descrevendo as características clínico-epidemiológicas dessa população. Para tal, entre dezembro de 2009 a dezembro de 2010, 56 cepas de CRAB (resistência definida mediante método de Kirby-Bauer) provenientes de 56 pacientes foram incluídas no estudo. Descreveram-se as características clínico-epidemiológicas dos mesmos. Quarenta e três (76,8%) dentre as 56 cepas foram estudadas quanto ao perfil de susceptibilidade quantitativo ao imipenem, tigeciclina e polimixina B, submetidas à pesquisa de metalo- β -lactamases e de oxacilinases, e avaliadas quanto ao padrão de distribuição clonal comum. Como resultados, observou-se que a idade média dos 56 pacientes foi de 61 anos (DP: $\pm 15,1$), e que 58,9% deles eram do sexo masculino. As patologias clínicas foram os principais motivos de admissão na UTI (71,4%), sendo “infecção” o diagnóstico mais frequente (66,1%). A maioria dos pacientes apresentou fatores de risco para colonização por CRAB (80,4%), sendo a utilização de procedimentos invasivos (87,5%) e antibioticoterapia prévia (77,6%) os mais frequentes. Cerca de 70% dos pacientes apresentaram apenas colonização por CRAB. A mediana de APACHE II à admissão na UTI foi 15 (1 – 32), e a mortalidade hospitalar foi de 59,0%. Das 43 cepas estudadas, 25 (58,1%) foram confirmadas como resistentes ao imipenem (CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$) pelos testes quantitativos. Dez (23,3%) cepas também apresentaram resistência a tigeciclina (CIM > 2 $\mu\text{g/mL}$) e três (7%) foram resistentes à polimixina (CIM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$). As 43 cepas apresentaram gene *bla*_{OXA-51}, confirmando a identificação da espécie como *Acinetobacter baumannii*, 22 (51,2%) carream o

gene *bla*_{OXA-23} e oito (18,6%) expressavam o gene *bla*_{OXA-143}. Dentre as 17 cepas sensíveis ao imipenem pela diluição em ágar, 14 (82,4%) não expressavam nenhuma das enzimas pesquisadas. Em nenhuma das cepas foi identificada a presença de metalo-β-lactamases. Através do ERIC-PCR foram identificados 15 clones distintos de *Acinetobacter baumannii* com predomínio de seis *clusters*, tendo como base 90% de similaridade. A partir dos dados apresentados, conclui-se que: (i) os pacientes estudados tinham gravidade moderada, e apresentavam elevada prevalência de fatores de risco para colonização /infecção por cepas CRAB; (ii) as cepas CRAB estudadas mostraram-se predominantemente multirresistentes a antibióticos, havendo frequência elevada de resistência à polimixina; (iii) conforme sugerido em outros estudos, a expressão de metalo-β-lactamases não representa mecanismo comum de resistência de cepas CRAB no Brasil, ao passo que a maioria das cepas apresentou gene *bla*_{OXA-23}, e algumas delas apresentaram OXA143, uma oxacilinase recentemente descrita; e (iv) o padrão endêmico das cepas é policlonal.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; Resistência a antimicrobianos; Carbapenêmicos, Epidemiologia Molecular.

ABSTRACT

The increasing frequency of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) represents a clinical and epidemiological challenging, with demands better understanding of this pathogen. Areas of special interest are *A. baumannii* resistance mechanisms and potential alternatives to antimicrobial treatment, as well as, the dissemination routes of this bacteria. Over the last 20 years, the improvement of molecular techniques brought a greater comprehension about the phenomenon of resistance acquisition and clonal distribution of *A. baumannii*. This study aimed to assess the enzymatic mechanisms involved in the carbapenem resistance presented by *A. baumannii*, and the genetic similarity pattern of CRAB strains, isolated from 56 patients attending a medical and coronary intensive care unit. Additionally, the clinical and epidemiological characteristics of this population were described. This was a cross-sectional study, involving 56 patients colonized or infected by CRAB strains, admitted in one of the intensive care of a university hospital, between December 2009 and December 2010. According to a protocol of the Infectious Diseases Service of our hospital, the strains of CRAB included in this study were conserved in temperature of -20 degree since the time of its original identification. 43 (76.8%) out of the 56 were recovered and underwent further microbiological phenotypic and genotypic studies. As results, the mean age of the 56 patients was 61 years (SD: ± 15.1), and 58.9% were male. The main reason for ICU admission was medical condition (71.4%), and "infection" was the most frequent diagnosis (66.1%). The majority of patients (80.4%) had risk factors for CRAB colonization, predominantly use of invasive devices (87.5%) and previous antibiotics therapy (77.6%). From the 56 isolates, 70% represented were colonization by CRAB. The median APACHE II score at ICU admission was 15 (1-32), and the hospital mortality was 59.0%. Among the 56 CRAB strains studied, 43 (76.8%) were evaluated by quantitative ST (susceptibility test) for imipenem, tigecycline and polymyxin B), expression of metallo- β -lactamases, expression of oxacilinases and clonal distribution by ERIC-PCR. Resistance to imipenem (MIC $\geq 16\mu\text{g/ml}$) by agar dilution method was confirmed in 25 (58.1%) of the 43 strains evaluated. Ten (23.3%) strains were resistant to tigecycline (MIC $> 2\mu\text{g/ml}$) and three were resistant to polymyxin B (MIC $\geq 4\mu\text{g/ml}$). The 43 strains were *bla*_{OXA-51} gene, confirming its identification as

Acinetobacter baumannii, 22 (51.2%) carried *bla*_{OXA-23} gene, 8 (18.6%) and expressed *bla*_{OXA-143} gene. 14 (82.4%) out of the 17 isolates susceptible to imipenem by agar dilution method did not express any of the enzymes studied. None of the strains studied showed the presence of metallo- β -lactamases. The ERIC-PCR identified 15 distinct clones of *Acinetobacter baumannii* with predominance of six clusters, based on 90% similarity. Top sum up, we concluded that: (i) the studied patients had moderate clinical severity score, and had a high prevalence of risk factors for colonization or infection by CRAB strains; (ii) CRAB strains studied showed predominantly multidrug resistance pattern, with the prevalence of polymyxin B resistance was high; (iii) as suggested in some others studies, the expression of metallo- β -lactamases is not a common resistance mechanism of CRAB strains in Brazil, while most strains showed *bla*_{OXA-23} gene, and some carried *bla*_{OXA-143} gene (iv) the genetic pattern of these endemic strains was polyclonal.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; Drug Resistance, Microbial; Carbapenems; Molecular Biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de resistência aos antimicrobianos do <i>Acinetobacter baumannii</i>	24
Figura 2 - Teste de disco difusão mostrando cepa de <i>A. baumannii</i> multidroga-resistente	30
Figura 3 - Ilustração do Teste de Hodge	31
Figura 4 - Determinação da CIM utilizando o método de diluição em ágar	54
Figura 5 - Determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana utilizando o método de disco-difusão e E-test [®]	54
Figura 6 - Pesquisa de M β L utilizando o método de disco-aproximação e Etest [®] M β L (imipenem-imipenem EDTA)	56
Figura 7 - Reação de PCR para detecção dos genes codificadores das enzimas OXA	59
Figura 8 - Origem das cepas de <i>A. baumannii</i> isoladas de pacientes internados na UTIC do HC/UFMG	62
Figura 9 - Dendrograma demonstrando a caracterização genotípica de 43 cepas de <i>A. baumannii</i> , isoladas de pacientes internados na UTIC HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010	73
Figura 10 - Dendrograma das cepas de <i>A. baumannii</i> resistentes ao imipenem de pacientes internados na UTIC HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos brasileiros sobre clonalidade e/ou expressão gênica de resistência em cepas CRAB	37
Quadro 2 - Procedimentos realizados pelas instituições participantes do estudo .	49
Quadro 3 - Avaliação da similaridade genética entre linhagens bacterianas utilizando o coeficiente de DICE (CD)	50
Quadro 4 - Alvos amplificados para a detecção de genes <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{MβL} e IS	58
Quadro 5 - CIM para imipenem, polimixina e tigeciclina, e genes de produção de oxacilinases (sombreado cepas IMP resistentes) identificados em 43 cepas de pacientes internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Idade, tempo de internação e escore APACHE II de 56 pacientes portadores de CRAB internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010	63
Tabela 2 - Tipo de internação e categoria diagnóstica de 56 pacientes portadores de CRAB internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010	64
Tabela 3 - Condições predisponentes, utilização prévia de procedimentos invasivos e antibióticos em 56 pacientes portadores de CRAB internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010	65
Tabela 4 - Presença de disfunção clínica e evolução de 56 pacientes portadores de CRAB internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010	66
Tabela 5 - Distribuição de frequência de CRAB por material, dos pacientes internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010	67
Tabela 6 - Classificação quanto a infecção hospitalar de 56 pacientes portadores de CRAB internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010	67
Tabela 7 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, por meio do método de disco difusão, de 56 cepas de <i>A. baumannii</i> isoladas de pacientes internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro 2009 e dezembro de 2010	69
Tabela 8 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, por meio do método de diluição em ágar, de 43 cepas de <i>A. baumannii</i> isoladas de pacientes internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APACHE	<i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation</i>
ATM	Antimicrobiano
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CRAB	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos
CVC	Cateter Vascular Central
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GIM	<i>German Imipenemase</i>
HC/UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
ICAAC	<i>Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>
IH	Infecção Hospitalar
IMP	Imipenemase
MDR	Multidroga-resistente
MR	Multirresistente
MYSTIC	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Colletion Programm</i>
MβL	Metalo-β-lactamase
NHSN	<i>National Healthcare Safety Network</i>
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
OXA	Oxacilinase
PAV	Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
pb	Par de bases
PBP	<i>Penicillin Binding Protein</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reation</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>

POL	Polimixina
SENTRY	<i>Antimicrobial Resistance Surveillance Programm</i>
SPM	São Paulo Metalo- β -lactamase
SVD	Sondagem Vesical de Demora
TEST	<i>Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial</i>
TIG	Tigeciclina
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTIC	Unidade de Terapia Intensiva e Coronariana
VIM	Verona Imipenemase
VM	Ventilação Mecânica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	ACINETOBACTER baumannii	22
2.1.1	Microbiologia, nomenclatura e taxonomia	22
2.1.2	Definição de resistência, mecanismos e transmissão de resistência	23
2.1.3	Mecanismos de resistência aos carbapenêmicos	26
2.1.3.1	Enzimático – Produção de β -lactamases	26
2.1.3.2	Outros mecanismos de resistência	27
2.2	DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA: MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL QUALITATIVA E QUANTITATIVA	28
2.2.1	Teste de disco difusão (Kirby-Bauer)	29
2.2.2	Testes para pesquisa de β -lactamases	30
2.2.3	Avaliação quantitativa da suscetibilidade aos antimicrobianos	31
2.3	DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA: BIOLOGIA MOLECULAR	32
2.4	EPIDEMIOLOGIA E IMPORTÂNCIA DO <i>A. baumannii</i> NO CONTEXTO DAS INFECÇÕES NOSOCOMIAIS	32
2.4.1	<i>Acinetobacter baumannii</i> na América Latina	34
2.5	MECANISMOS E FATORES DE RISCO PARA COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO POR <i>A. baumannii</i>	34
2.6	SURTOS E COLONIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES	35
2.7	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR	38
2.7.1	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> – PFGE	39
2.7.2	Métodos de tipagem molecular baseados em PCR	39
2.7.3	Ribotipagem	40
2.8	MORTALIDADE ASSOCIADA AO ACINETOBACTER	40
2.9	TRATAMENTO	41

2.9.1	Carbapenêmicos	41
2.9.2	Polimixinas	41
2.9.3	Tigeciclina	43
2.9.4	Ampicilina-Sulbactam	43
2.9.5	Terapia combinada	44
3	JUSTIFICATIVA	45
4	OBJETIVOS	46
4.1	GERAL	46
4.2	ESPECÍFICOS	46
5	MATERIAIS E MÉTODOS	47
5.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	47
5.2	CASUÍSTICA	47
5.3	INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS NO ESTUDO	49
5.4	DEFINIÇÕES	49
5.5	MATERIAL	50
5.6	MÉTODO	51
5.6.1	Coleta e processamento das amostras biológicas	51
5.6.1.1	Teste de sensibilidade qualitativo	52
5.6.1.2	Teste de sensibilidade quantitativo	53
5.6.1.3	Pesquisa de carbapenemases (Triagem: dupla-difusão e E-test®)	55
5.6.1.4	Biologia molecular	56
5.7	ASPECTOS ÉTICOS	60
5.8	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FORMATAÇÃO	60
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
6	RESULTADOS	62
6.1	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES	62
6.2	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS	68
6.3	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CEPAS	68
6.3.1	Perfil de sensibilidade qualitativo pelo método de disco difusão	68

6.3.2	Perfil de sensibilidade quantitativo pela diluição em ágar (CIM)	69
6.4	CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA	70
6.4.1	Teste de dupla difusão com disco (TDDD)	70
6.4.2	Pesquisa de Oxacilinases	71
6.5	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E ESTUDO DE CLONALIDADE	71
6.5.1	Análise de polimorfismo (ERIC)	71
7	DISCUSSÃO	76
8	CONCLUSÕES	86
9	LIMITAÇÕES	87
10	PROPOSTAS	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	APÊNDICE	102
	ANEXOS	104

1 INTRODUÇÃO

O *Acinetobacter baumannii* é um dos principais micro-organismos associados às infecções nosocomiais em todo o mundo, provavelmente devido à sua fácil disseminação no ambiente e à sua habilidade em desenvolver resistência aos antimicrobianos e antissépticos disponíveis [1]. O *A. baumannii* é considerado patógeno oportunista, causando infecções em pacientes gravemente enfermos, debilitados e portadores de imunossupressão, notadamente naqueles internados em unidades de terapia intensiva (UTI) [2].

O tratamento das infecções causadas pelo *A. baumannii* é particularmente difícil, não somente devido à fragilidade do hospedeiro como também pela capacidade do micro-organismo em desenvolver resistência e a limitada biodisponibilidade de alguns antimicrobianos em sítios como o pulmão e o sistema nervoso central [3].

Os carbapenêmicos são antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro, e constituem a principal classe de drogas utilizadas para o tratamento de infecções graves por *A. baumannii*. Entretanto, nos últimos anos, diversos autores têm relatado aumento progressivo do isolamento de cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (CRAB). A resistência aos carbapenêmicos representa um fenômeno mundial [4-8], podendo ser secundária a diversos mecanismos, sejam eles intrínsecos ou adquiridos pela bactéria. Dentre eles, cita-se a perda de porinas, alteração na afinidade das proteínas ligadoras de penicilina (PBP) e diferentes β -lactamases da classe B (metalo- β -lactamases) e classe D (oxacilinases) [9, 10]. Neste contexto, as opções terapêuticas são limitadas e frequentemente cepas de CRAB são sensíveis apenas às polimixinas [11, 12].

No Brasil, as cepas de CRAB apresentam relevância epidemiológica, constituindo um grande desafio para as instituições de saúde, no que concerne ao manejo da disseminação desse micro-organismo e do tratamento das infecções por ele causadas. Assim, em 2007, por iniciativa da Vigilância Sanitária do Município de Porto Alegre/RS (VS-POA), definiu-se pela notificação sistemática de todos os pacientes portadores de CRAB [13]. Entretanto, a despeito dessa iniciativa, pouco se conhece do mecanismo de resistência e característica de disseminação dessas cepas no território nacional. Nota-se que são poucos os estudos publicados com

cepas de outras regiões do Brasil, restritos às regiões sul e sudeste, sendo que no estado de Minas Gerais, no nosso conhecimento, apenas dois estudos foram publicados até 2011 [14, 15].

Dessa maneira, considerando a crescente frequência de isolamento de CRAB no Brasil e a escassez de informações que retratem esse panorama, inclusive em nossa região, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que visem caracterizar essas infecções em nosso meio, identificando e caracterizando a população de pacientes acometidos, assim como as características fenotípicas e genotípicas dessas bactérias. Este estudo visou contribuir para o esclarecimento de algumas dessas questões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 **ACINETOBACTER BAUMANNII**

2.1.1 Microbiologia, nomenclatura e taxonomia

O gênero *Acinetobacter* é formado por micro-organismos cocobacilares de coloração negativa ao Gram, estritamente aeróbios, imóveis, que crescem em meios laboratoriais não seletivos, à temperatura entre 20°C e 30°C. Esses micro-organismos não formam esporos, não são fermentadores da glicose, são oxidase-negativos e catalase-positivos. O gênero *Acinetobacter* tem uma longa e confusa história taxonômica. Em 1911, Beijerinck, um microbiologista holandês, trabalhando em Delft, isolou e descreveu um micro-organismo chamado *Micrococcus calcoaceticus*, o primeiro exemplo de um micro-organismo que seria reconhecido hoje como *Acinetobacter* [16]. Desde então, membros do gênero têm sido classificados sob uma grande variedade de nomes (Ex: *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*), o que inicialmente resultou em dificuldades no estabelecimento epidemiológico e da real importância clínica desses micro-organismos [17].

A designação atual do gênero *Acinetobacter* (do grego – Akinetos – imóveis), foi inicialmente proposta por Brisou e Prévot em 1954, para separar os micro-organismos imóveis dos móveis dentro do gênero *Achromobacter* [18]. Atualmente, com a utilização de métodos moleculares já foi estabelecida a identidade de no mínimo 33 espécies distintas pertencentes ao gênero *Acinetobacter*, dos quais 18 têm nomes de suas espécies formalmente definidas. A genoespécie 1 (*A. calcoaceticus*), genoespécie 2 (*A. baumannii*), genoespécies 3 e genoespécie 13TU compõem o chamado complexo *A. calcoaceticus-baumannii* [3]. Devido à dificuldade de diferenciação desses isolados por características fenotípicas, o termo complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* tem sido frequentemente utilizado [19]. O *A. baumannii* é a espécie mais isolada, representando mais de 90% das espécies de *Acinetobacter* spp. e é a genoespécie que apresenta maior resistência aos

antimicrobianos (ATM). Outras espécies, tais como *Acinetobacter lwoffii* e *Acinetobacter ursingii*, também têm sido relatadas em infecções humanas, e são mais sensíveis aos antimicrobianos [17].

2.1.2 Definição de resistência, mecanismos e transmissão de resistência

A definição de “multidroga-resistência” (MDR) para o *Acinetobacter* ainda não está padronizada na literatura. Dentre as definições mais frequentemente utilizadas tem-se a resistência a três ou mais classes de ATM e a resistência isolada aos carbapenêmicos [20]. Outra terminologia se refere à panresistência, que é caracterizada pela resistência a todas as opções terapêuticas disponíveis, incluindo-se as polimixinas [21].

De maneira geral, a resistência aos ATM ocorre através de mecanismos complexos, ainda não completamente elucidados. Pode ser estabelecida como intrínseca, quando é uma propriedade natural do micro-organismo, ou adquirida, quando reflete modificações na estrutura ou funcionamento da célula, o que bloqueia a ação da droga. Sumariamente, têm-se como principais mecanismos de resistência alteração do sítio de ação, redução da incorporação da droga por diminuição da permeabilidade ou efluxo, e produção de enzimas inativadoras. Essas propriedades podem ser adquiridas *per si* através de mutação gênica ou ocorrer via plasmídeo de material genético alheio [21, 22].

O *A. baumannii* é caracterizado por apresentar resistência intrínseca a vários ATM [22], e dentre os mecanismos de resistência descritos cita-se a produção de enzimas inativadoras, bomba de efluxo, modificação do alvo e/ou deficiência de canais de porina (Figura 1). Um artigo de revisão publicado em 2007 ressalta a importância do mecanismo de efluxo de drogas e das alterações de permeabilidade para o *A. baumannii* [23].

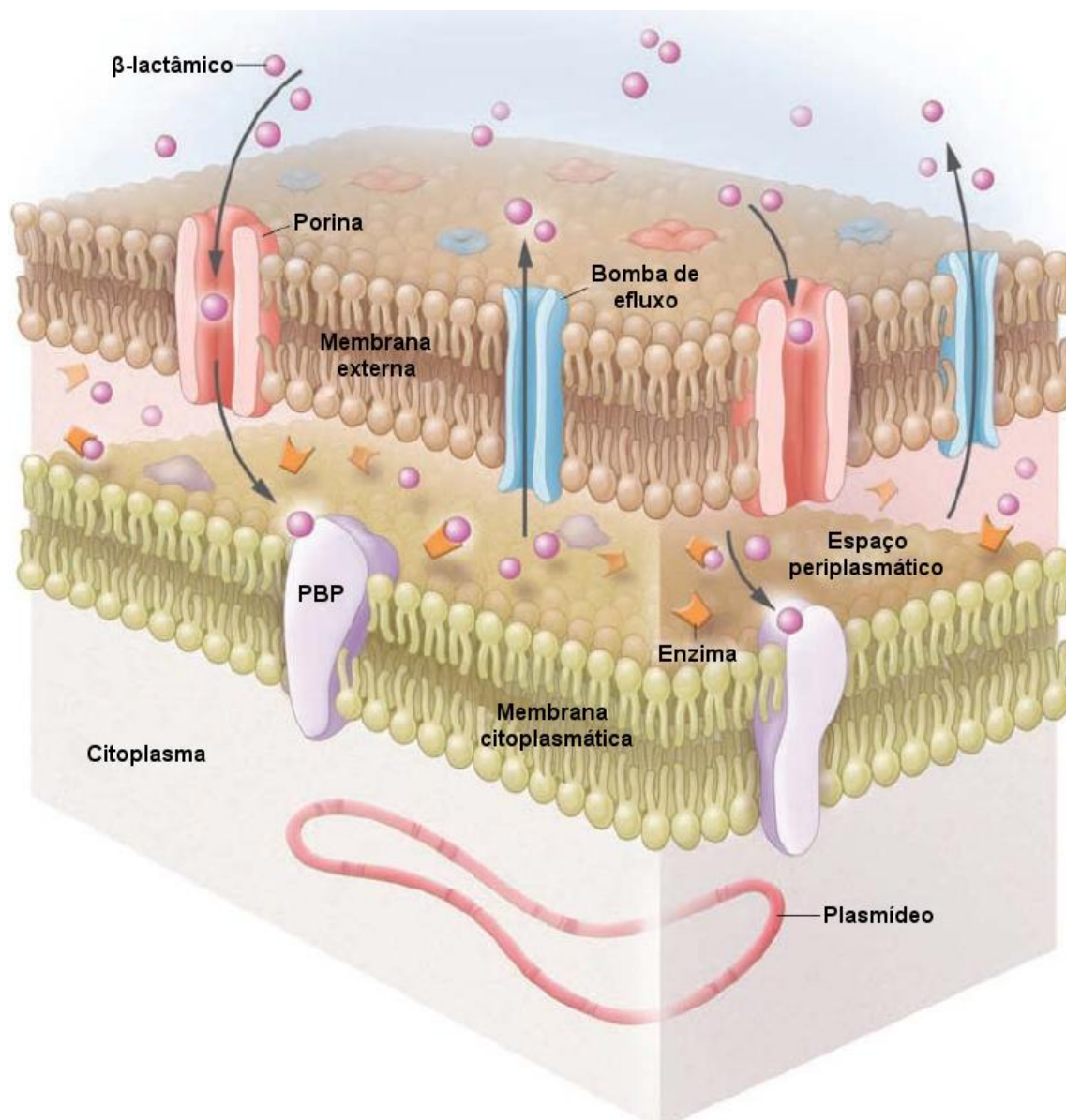


Figura 1 – Mecanismos de resistência aos antimicrobianos do *Acinetobacter baumannii* (Adaptado de Munoz-Price & Weinstein, 2008).

A aquisição de resistência em cepas de *A. baumannii* foi inicialmente observada na década de 1970, principalmente diante das cefalosporinas e quinolonas. Atualmente, a resistência aos carbapenêmicos e a panresistência representam um desafio ainda maior. Acredita-se que o aumento da prevalência de cepas CRAB se relaciona com o elevado consumo de carbapenêmicos nos últimos anos, decorrente da alta prevalência de bacilos de coloração negativa ao Gram resistentes a cefalosporinas de amplo espectro. Outra possibilidade seria aquisição de plasmídeos contendo genes de resistência aos carbapenêmicos.

Plasmídeos podem ter desde poucas kilobases (kb) até aproximadamente 400 kb, mas são menores que os cromossomas bacterianos. Mantêm-se em ambientes por longos períodos, mudando repetidamente de hospedeiro e eventualmente podem somar fatores de virulência-resistência a uma determinada cepa bacteriana, viabilizando surtos de infecção [24]. A importância dos plasmídeos na aquisição de resistência no *Acinetobacter* está na maioria das vezes relacionada a estruturas de integrons que os plasmídeos carregam. São quatro classes conhecidas de integrons. Os integrons de classes I e II são descritos em amostras de *Acinetobacter* MDR ambientais e clínicas, podendo estar associados a surtos. Esses integrons são frequentemente transferidos por enterobactérias e espécies de *Pseudomonas*. Um exemplo clássico é a aquisição de integron classe I (carreador de β -lactamase de espectro estendido *bla*_{VEB-1} e de outros seis genes de resistência) oriundo de *Pseudomonas aeruginosa* [25].

Transposons, diferentemente de plasmídeos, encontram-se sempre inseridos em outros replicons (plasmídeos e cromossomas). Apresentam a capacidade de incorporar marcadores de resistência por várias formas, e a competência em se transferir para outros replicons, o que permite a aquisição e transferência de resistência a antibióticos [26].

Nos integrons, identificados mais recentemente, esses "elementos de DNA" potencialmente móveis são capazes de integrar pequenos "cassetes de DNA" contendo genes de resistência. Grande parte dos genes de resistência a antibióticos em plasmídeos e transposons de bactérias de coloração negativa ao Gram encontram-se em integrons como estruturas precisas definidas como cassetes de DNA, unidades funcionais que podem ser mobilizadas independentemente [27]. Integrons encontram-se envolvidos em fenômenos de deleção, duplicação e rearranjo de genes de resistência, e há evidências de sua efetiva capacidade de "mobilidade" [28].

2.1.3 Mecanismos de resistência aos carbapenêmicos

2.1.3.1 Enzimático – Produção de β -lactamases

A produção de β -lactamases (enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico, inativando o antimicrobiano) é o mecanismo de resistência mais prevalente no *A. baumannii*. No entanto, devido à complexidade da natureza desse micro-organismo, frequentemente, múltiplos mecanismos de resistência coexistem para produzir o mesmo fenótipo, ou seja, resistência aos carbapenêmicos [18].

Segundo Ambler as β -lactamases se classificam em quatro tipos moleculares (A, B, C e D), baseadas na homologia da sequência de aminoácidos e nas diferenças em seus mecanismos catalíticos. Podem também ser divididas em dois tipos (constituente metal ou aminoácido): metalo- β -lactamases (classe B) e serina- β -lactamases (classes A, C e D). Nesse caso, as principais enzimas relacionadas à resistência são as metalo- β -lactamases (M β L) e as de classe D, também denominadas como oxacilinasas [10, 29].

As M β L são β -lactamases que hidrolisam todos os β -lactâmicos (incluindo os carbapenêmicos) comercialmente disponíveis, sendo a única exceção um monobactam, o aztreonam [30]. Essas enzimas caracterizam-se por necessitarem de dois íons divalentes, usualmente zinco, como cofator para atividade catalítica [31]. Até o início da década de 1990, as M β L não foram consideradas clinicamente importantes, pois eram produzidas intrinsecamente por micro-organismos encontrados no meio ambiente e por oportunistas que não causavam infecções relevantes, exceto *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus anthracis*. Entretanto desde a descrição de M β L mediadas por plasmídeos em micro-organismos de relevância clínica (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e em algumas enterobactérias), a produção dessas enzimas passou a ser considerado um importante mecanismo de resistência [32].

Atualmente são conhecidas nove subclasses de M β L adquiridas: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase), GIM (German imipenemase), SIM-1 (Seoul imipenemase), AIM (Austrália imipenemase), KHM (Kyorin University Hospital Metallo- β -lactamase), DIM-1 (Dutch

imipenemase) e NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase) [33-41].

Para o *A. baumannii* as duas principais M β L são as tipo IMP e VIM. Elas representam uma significativa ameaça, pois frequentemente se localizam em materiais genéticos móveis – integrons - principalmente da classe I, facilmente transferidos entre as bactérias [9].

As oxacilinases, β -lactamases pertencentes à classe D de Ambler, são as mais frequentemente descritas no *A. baumannii*. Elas comumente hidrolisam oxacilina, amoxicilina, meticilina, cefaloridina e cefalotina. Entretanto, quando essas enzimas, originalmente de pequeno espectro, sofrem mutações, pode ocorrer ampliação de sua resistência a cefalosporinas de terceira e quarta gerações e também a carbapenêmicos (OXA-carbapenemases) [21].

Atualmente, baseando-se apenas na homologia, foram descritas cepas de CRAB com OXA-carbapenemase cromossômica intrínseca, OXA-51, e as oxacilinases adquiridas OXA-23 (inclui OXA-27 e OXA-49), OXA-24 (inclui OXA-25, OXA-26 e OXA-40) e OXA58. Outros grupos menores, como OXA-143 e OXA-72, estão atualmente emergindo e aumentando sua relevância clínica [32, 42, 43]. As oxacilinases adquiridas podem ser tanto cromossômicas quanto plasmidiais.

Isolados resistentes aos carbapenêmicos no Brasil são mais comumente relacionados à produção de β -lactamases, principalmente oxacilinases, sendo OXA-23 a mais frequente, com surtos relatados desde 2003 [44, 45].

Nos últimos anos, cepas OXA-143 também têm sido relatadas no Brasil. Foram inicialmente descritas em 2009 por Higgins *et al.* que as identificaram em cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos de isolados brasileiros [42]. Recentemente, outro autor observou uma elevada prevalência de *A. baumannii* carreando genes OXA-143 e OXA-23, isolados de pacientes internados em oito diferentes hospitais do Brasil [43].

2.1.3.2 Outros mecanismos de resistência

A resistência a carbapenêmicos, também tem sido associada a mecanismos não enzimáticos, incluindo alterações nas proteínas de membrana externa (OMP), alterações na afinidade ou expressão das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) e

bombas de efluxo de múltiplas drogas [18].

Porinas são proteínas que formam canais que permitem o transporte de moléculas através da membrana lipídica. Variações em suas estruturas como um mecanismo de escape da pressão antibacteriana são estratégias de sobrevivência que muitas bactérias têm desenvolvido. Uma das limitações do conhecimento a respeito do *A. baumannii* é a falta de informações relativas às suas OMPs e propriedades de permeabilidade de sua membrana externa. Poucas OMPs têm sido relatadas nesses micro-organismos, e pouco se conhece sobre elas. A membrana externa do *A. baumannii* é menos permeável aos antimicrobianos que a da *E. coli*, fato que pode ser explicado pelo pequeno número e tamanho de suas OMPs, o que favorece a resistência intrínseca a vários ATM [18]. A redução na expressão das OMPs de 22 e 33 quilodaltons (kDa), juntamente com a produção de carbapenemases, foi associada como mecanismo possível de resistência em *A. baumannii* [21]. Alterações na síntese de diversas porinas de membrana externa, em geral resultam em aumento da resistência simultaneamente a vários ATM, sendo relatadas como resultado direto da sua exposição.

A redução na expressão das PBPs também está associada à resistência do *A. baumannii* aos carbapenêmicos, como foi descrito por Fernandez-Cuenca *et al.* (2003), que identificaram uma redução na expressão da PBP-2 em isolados de *A. baumannii*, em Sevilha, na Espanha [46].

Nas bactérias de coloração negativa ao Gram, a membrana externa limita a entrada dos antimicrobianos na célula bacteriana e múltiplas bombas de efluxo exportam ativamente essas drogas para fora da membrana externa [23]. Mutações genéticas podem determinar uma super-expressão da bomba de efluxo e resultar em resistência aos antimicrobianos.

2.2 DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA: MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL QUALITATIVA E QUANTITATIVA

O diagnóstico da resistência bacteriana pode ser avaliado através de vários métodos. O laboratório de microbiologia realiza exames que determinam a resistência *in vitro* e esses resultados permitem a adequação da prescrição empírica

e avaliam a evolução da resistência da microbiota local.

Os métodos e critérios para avaliação da resistência são recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e adotados pela maioria dos laboratórios de microbiologia. Contudo, o resultado desses testes depende de coleta e armazenamento adequado como também da capacidade de interpretação do examinador.

Os testes de suscetibilidade são indicados quando a sensibilidade não é presumida pela identificação da espécie. Abaixo, serão mencionados os testes utilizados na rotina de avaliação do perfil de sensibilidade do *A. baumannii*.

2.2.1 Teste de disco difusão (Kirby-Bauer)

Considerado um teste de rastreamento. Nesse caso, coloca-se o disco contendo antibiótico em meio de cultura no qual foi semeado o micro-organismo, avaliando a inibição de seu crescimento na região próxima ao disco (Figura 2)[47]. A zona (diâmetro) de não crescimento define a sensibilidade ou não do micro-organismo estudado baseando-se em normas padronizadas pelo CLSI. O antibiograma para o *A. baumannii*, segundo recomendação do CLSI, avalia os seguintes antimicrobianos como drogas de primeira linha: ampicilina-sulbactam, ceftazidime, ciprofloxacino, levofloxacino, imipenem, meropenem, gentamicina e tobramicina. Outras drogas, consideradas de segunda linha, podem ser testadas quando necessário.

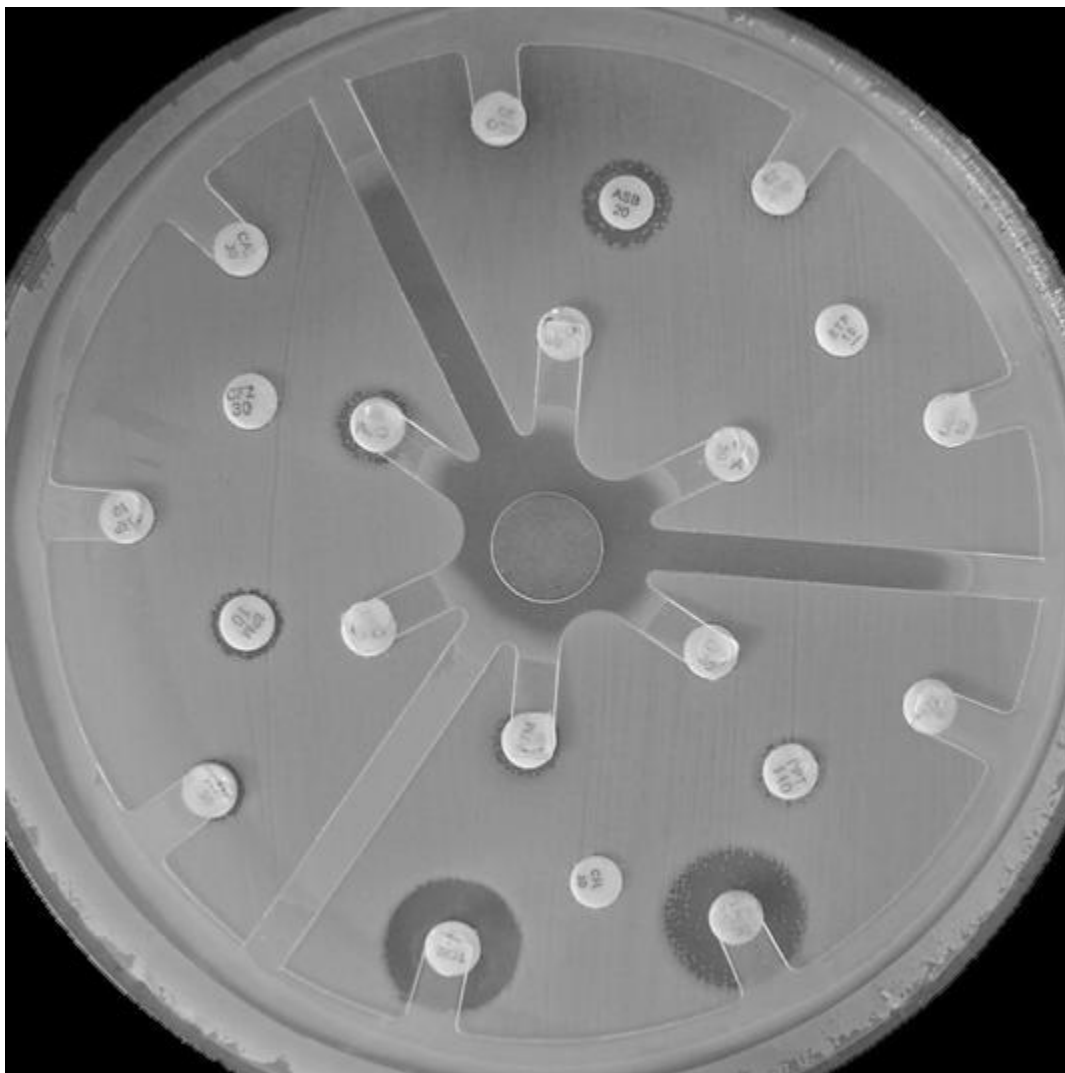


Figura 2 – Teste de disco difusão mostrando cepa de *A. baumannii* multidroga-resistente.

2.2.2 Testes para pesquisa de β -lactamases

Outra forma disponível para detecção de resistência fenotípica é o reconhecimento da presença de enzimas inativadoras de antimicrobianos através da pesquisa de β -lactamases [48]. Um dos métodos para detecção de penicilinases em várias espécies de bactérias foi descrito por Hodge em 1978 (Figura 3). Atualmente este teste foi modificado para favorecer a detecção de carbapenemases [49] em *A. baumannii* e tem apresentado positividade em cepas produtoras de enzimas do tipo OXA, como observado nos estudos de Lopez-Otsoa *et al.* [50] e Canduela *et al.* [51], nos quais os isolados que apresentavam gene *bla*_{OXA-40} foram positivos para o teste.

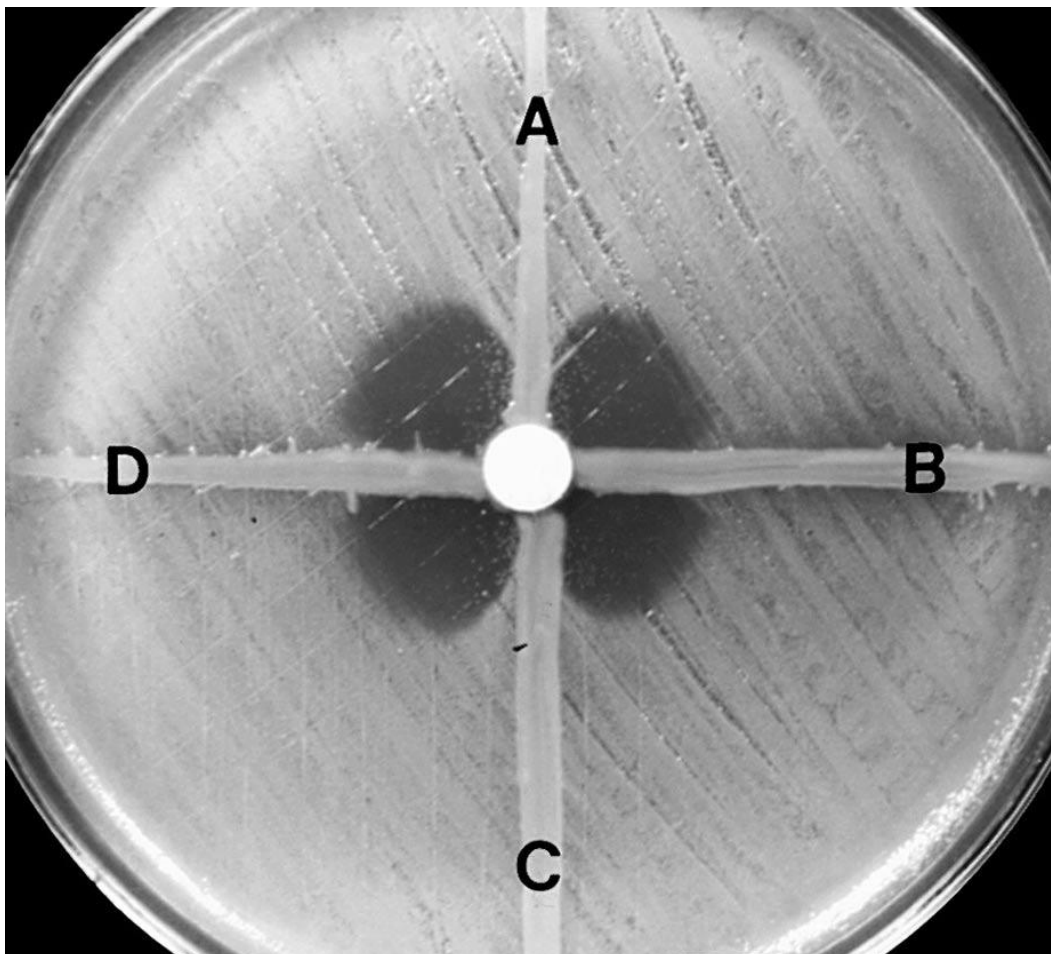


Figura 3 – Ilustração do Teste de Hodge.

Legenda: A e C: Presença de distorção na zona de inibição de amostras resistentes ao imipenem. B e D: Ausência de distorção na zona de inibição de amostras sensíveis ao imipenem.

Fonte: LEE *et al.*, 2001.

2.2.3 Avaliação quantitativa da suscetibilidade aos antimicrobianos

A concentração inibitória mínima (CIM) corresponde à menor concentração de antimicrobiano necessária para impedir o crescimento bacteriano. A determinação da CIM pode ser obtida por meio de várias metodologias, como o gradiente de difusão (fitas E-test[®] – *bioMérieux*) e diluição em caldo por macro ou microdiluição (automatizadas ou não).

2.3 DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA: BIOLOGIA MOLECULAR

Métodos de biologia molecular também podem ser úteis na identificação e caracterização de resistência microbiana. Permitem, por exemplo, identificar os diferentes mecanismos de resistência, tais como produção de metalo- β -lactamases, oxacilinases, alterações nas proteínas de membrana externa (porinas) e super-expressão da bomba de efluxo [52]. Métodos baseados em PCR utilizam *primers* para amplificar e sequenciar genes de resistência. Esses métodos não são utilizados rotineiramente na maioria dos laboratórios clínicos, mas fazem parte do arsenal de laboratórios de pesquisa de resistência.

2.4 EPIDEMIOLOGIA E IMPORTÂNCIA DO *A. BAUMANNII* NO CONTEXTO DAS INFECÇÕES NOSOCOMIAIS

O *A. baumannii* tem emergido como um dos principais patógenos problema nas instituições de saúde. Seu significado clínico, especialmente nas duas últimas décadas, tem sido impulsionado pela sua capacidade de super-regulação ou de aquisição de mecanismos de resistência, tornando-o um grande desafio à era antimicrobiana [18].

O *A. baumannii* é um patógeno oportunista que causa infecções em pacientes debilitados, internados em UTI, particularmente naqueles submetidos à ventilação mecânica (VM), e naqueles portadores de lesões traumáticas e queimaduras. Existem também alguns relatos de infecções causadas por esse micro-organismo adquiridas na comunidade, em países tropicais e subtropicais, usualmente em portadores de comorbidades [17]. Infecções comunitárias graves, a exemplo da pneumonia, têm sido relatadas na Austrália e na Ásia, apresentando elevados índices de letalidade [1].

De acordo com dados do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), maiores taxas de infecção hospitalar (IH) por *A. baumannii* são observadas no verão, em comparação a outras estações do ano. Possíveis explicações para essa sazonalidade seriam a elevação da temperatura e da umidade do ar, que favorecem

o crescimento do micro-organismo em seu habitat natural, como também a contaminação de ambientes, a exemplo de filtros de ar condicionado [1].

O *A. baumannii* tem sido, frequentemente, relacionado a guerras e desastres naturais, sendo que na Guerra do Vietnã foram relatados 63 casos de infecções de pele e partes moles em militares. No período de 2002 a 2004, 85 infecções da corrente sanguínea, causadas por *A. baumannii*, foram relatadas em soldados no Afeganistão e na região do Iraque-Kuwait. Dentre os isolados, 35% só eram sensíveis ao imipenem e 4% mostravam resistência a todos os ATM habitualmente utilizados. Após o tsunami do sudeste asiático, 20% das cepas de *Acinetobacter* MDR eram provenientes de 17 pacientes com infecções de pele e partes moles além de fraturas graves [1].

Nas diferentes instituições de saúde, *A. baumannii* apresenta características peculiares quanto à frequência, topografia, graus de invasibilidade e virulência. A maioria dos dados referentes à IH por esse micro-organismo é baseada em investigações de surtos.

O aumento da resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos tem sido demonstrado em diversos continentes, sendo que vários surtos, relacionados à infecção e colonização por esse micro-organismo têm sido descritos no mundo [4-8]. Um estudo multicêntrico prospectivo realizado na Espanha, com 221 casos, reportou que 53% dos pacientes apresentaram infecções por *A. baumannii*, sendo mais de 40% das cepas CRAB. Mais de 90% das infecções foram adquiridas em hospitais e apenas 4% na comunidade. Nesse estudo, as infecções do trato respiratório foram as mais comuns (51%), seguida por infecção de sítio cirúrgico (16%) e infecções do trato urinário (11%). Bacteriemia representou apenas 3% de todas as infecções [53].

Um estudo retrospectivo, realizado em um hospital escola na França, no período de 2002 a 2004, evidenciou uma distribuição diferente das infecções. Nele foram identificadas 656 infecções por *A. baumannii*, e exsudato e abscessos cutâneos foram os tipos de infecções mais frequentes (32%), seguidos por infecção do trato urinário (25%), do trato respiratório (20%) e bacteriemia (12%) [54].

2.4.1 *Acinetobacter baumannii* na América Latina

Embora existam dados limitados sobre a susceptibilidade do *A. baumannii* na América Latina, estudos prévios têm demonstrado que isolados desse continente são consideravelmente menos susceptíveis aos agentes ATM do que os coletados na América do Norte e Europa [55, 56]. Dados do programa SENTRY – *Antimicrobial Resistance Surveillance Programm*, programa de vigilância de resistência bacteriana aos ATM, de hospitais brasileiros, no período de janeiro de 1997 a dezembro de 1999, demonstraram uma prevalência de 6,7% de infecções causadas por *Acinetobacter* spp., sendo esse o terceiro micro-organismo mais frequente em infecções do trato respiratório, com prevalência de 10,8%. No período avaliado pelo estudo, o percentual de resistência ao imipenem já era de aproximadamente 12% [57].

Segundo o MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Colletion Programm*) em avaliação de sete UTIs de quatro cidades brasileiras no ano de 2002, *A. baumannii* foi o segundo patógeno mais frequente nas infecções (17,1%). A sensibilidade aos carbapenêmicos foi de 89%, no período avaliado [58].

Mais recentemente, o programa SENTRY (2001 a 2004) evidenciou que a susceptibilidade aos antimicrobianos de *Acinetobacter* spp. varia de acordo com sua origem geográfica. No geral, as cepas testadas foram resistentes a muitos antimicrobianos, independente de sua região. Entretanto, níveis de susceptibilidade aos carbapenêmicos foram mais baixos entre os isolados da Europa e Ásia e região do Pacífico [59].

2.5 MECANISMOS E FATORES DE RISCO PARA COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO POR *A. BAUMANNII*

O *Acinetobacter* spp. pode fazer parte da microbiota transitória da pele, principalmente das regiões axilares e inguinais. Em um inquérito realizado na Alemanha, os autores observaram cerca de 40% de colonização em indivíduos da comunidade, e acima de 75% nos indivíduos hospitalizados [60]. Especificamente, o

A. baumannii aparece raramente em indivíduos saudáveis. Por exemplo, esta espécie foi raramente encontrada em pele e fezes de indivíduos saudáveis em levantamento feito na Holanda [61].

A maioria das IH causadas por *A. baumannii* acomete órgãos com um alto conteúdo de líquido, tais como o trato respiratório, líquido peritoneal e trato urinário, e estão associadas à utilização de dispositivos invasivos. Os mecanismos envolvidos na progressão das infecções ainda não estão claros. Não existe qualquer evidência sobre a produção de toxinas ou citolisinas, e poucos fatores de virulência têm sido identificados [62]. Recentemente, durante a investigação de um surto por *A. baumannii* MDR na Espanha, dois genes com importante papel na virulência foram detectados em plasmídeos de dois clones, associados ao gene *bla*_{OXA-24}: gene septicolisina-*like* e outro gene receptor TonB-dependente [63].

O *A. baumannii* adere a diferentes tipos de superfícies (biológicas e não biológicas), nas quais pode formar biofilme, e com isso permitir a colonização de material protético. Como o ATM não penetra adequadamente no biofilme, pode haver maior desenvolvimento de resistência a drogas e evasão do sistema imune do hospedeiro [62].

Diversos fatores de risco têm sido associados à colonização e infecção por *A. baumannii*. Dentre eles, cita-se tempo de permanência hospitalar e em UTI; traumas; procedimentos cirúrgicos; uso de procedimentos invasivos (ventilação mecânica, cateter vascular central, traqueostomia); prematuridade; antibioticoterapia de amplo espectro prévia [64]. A prevalência de pacientes colonizados em UTI foi evidenciada como um importante fator de risco para a aquisição de CRAB [65].

2.6 SURTOS E COLONIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES

A sobrevivida prolongada de *A. baumannii* em superfícies inertes deve-se à pequena exigência nutricional, já que esse micro-organismo cresce em várias temperaturas e em diferentes valores de pH. Devido à facilidade em contaminar ambientes e de resistir aos ATM e ao ressecamento, *A. baumannii* tem elevada propensão de causar surtos no ambiente hospitalar, inclusive com padrão sazonal [66].

Vários autores sugerem que a sobrevivência de *Acinetobacter* no ambiente possa contribuir para a transmissão de micro-organismos durante os surtos, sendo o ambiente considerado um importante reservatório. Jawad *et al.* [67] demonstraram que esse micro-organismo sobrevive até 20 dias em condições de umidade de 31%. Outros autores observaram a recuperação desse micro-organismo no leito de paciente colonizado cerca de nove dias após a alta [68]. Outro estudo, conduzido por Wendt *et al.* [69] discute a persistência do *Acinetobacter* em superfícies também sob condições de baixa umidade. Posteriormente, Houang *et al.* [70] reforçaram o papel da contaminação ambiental do micro-organismo com a sobrevivência do mesmo, e a relevância dos processos de limpeza e descontaminação, inclusive com hipoclorito. Esses autores salientaram que o ambiente serve como reservatório, mas que não atua isoladamente na disseminação. Mais recentemente, um estudo demonstrou recuperação da cepa e persistência de um clone de *Acinetobacter* no ambiente por período superior a um ano [71].

Em um surto ocorrido em hospital da Coréia do Sul com cepas de *A. baumannii* resistentes a imipenem, observou-se que a maioria delas era produtora de OXA-23, carbapenemase da classe D, e de origem clonal comum [72]. Surtos multi-institucionais descritos na França (entre 2003 a 2004) constataram, em análise genotípica, similaridade genética nas 290 amostras, sendo que a maioria dos pacientes esteve hospitalizada em UTI [73]. Em outro surto multi-institucional ocorrido em Nova York (15 hospitais), observou-se clonalidade em 62 dos 419 isolados, sendo que a maioria era resistente a imipenem ou a todos os antimicrobianos padronizados [74].

No Brasil, surto ocorrido em 1999 (publicado em 2003) em dois hospitais universitários de Curitiba revelou a presença *A. baumannii* produtores de OXA-23. O principal sítio de infecção foi o pulmão [44]. Carvalho *et al.* relataram, em 2009, a disseminação de *A. baumannii* MDR/OXA-23 em oito hospitais públicos e privados no Rio de Janeiro, e demonstraram a ocorrência de isolados clonais e não clonais, sendo dois genótipos predominantes [45]. Um estudo de caso-controle de um surto em UTI neonatal em Uberlândia - Minas Gerais descreveu os principais fatores de risco para aquisição de *A. baumannii* MDR (sensíveis aos carbapenêmicos) e verificou a presença de dois clones distintos [14]. Ainda, recentemente foi descrito um estudo caso-controle conduzido no HC-UFMG que demonstrou que infecções prévias, utilização de procedimentos invasivos, antibioticoterapia prévia com

cefalosporina e principalmente com carbapenêmicos, além da gravidade das condições clínicas foram fatores associados à colonização/infecção por CRAB, sendo que 30% desses pacientes evoluíram para o óbito [15].

Segundo Villegas & Hartstein, em uma extensa revisão dos surtos de *Acinetobacter* ocorridos entre 1977-2000, esse agente está associado a elevadas taxas de mortalidade, aumento da permanência em UTI e aumento do custo de internação [75].

Quadro 1 - Estudos brasileiros sobre clonalidade e/ou expressão gênica de resistência em cepas CRAB

Autor/Ano	Local	Amostra (n)	M β L	Oxacilinase	Clonalidade	Dados clínico-epidemiológicos
Costa et al. 2000	São Paulo/SP	6	ND	ND	Clonal	Não
Dalla-Costa et al. 2003	Curitiba/PR	8	Negativa	OXA-23	Clonal	Sim
Carvalho et al. 2009	Rio de Janeiro/RJ	110	Negativa	OXA-23	Policlonal	Não
Higgins et al. 2009	São Paulo/SP	3	Negativa	OXA-143	NI	Não
Martins et al. 2009	Porto Alegre/RS	53	NI	OXA-23	Policlonal	Não
Carneiro et al. 2010	Londrina/PR	29	NI	OXA-23	Policlonal	Sim
Prates et al. 2010	Porto Alegre/RS	66	NI	OXA-23	Policlonal	Sim
Saalfeld et al. 2010	Londrina/PR	150	NI	NI	Policlonal	Não
Schimith Bier et al. 2010	Curitiba/PR	172	Negativa	OXA-23	Policlonal	Sim
Antonio. 2011	São Paulo/SP e Paraná	36	Negativa	OXA-23, 58, 72 e 143	Policlonal	Não
Clemente et al. 2011	Belo Horizonte	15	Negativa	OXA-143	Policlonal	Sim
Figueiredo et al. 2011	Niteroi/RJ	20	NI	OXA-23 e 58	NI	Não
Ferreira et al. 2012	Porto Alegre/RS	274	Negativa	OXA-23	Policlonal	Não

ND: Não definido; NI: Não investigado.

2.7 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Vale salientar que, por tratar-se de micro-organismo frequentemente envolvido em surtos, a avaliação de clonalidade é necessária para o controle e prevenção da disseminação do *A. baumannii*. O desenvolvimento de instrumental molecular de tipagem permitiu o entendimento da epidemiologia dessas infecções e demonstrou a presença ou não de heterogeneidade dos isolados envolvidos em surtos. Dessa maneira, a caracterização epidemiológica de infecções nosocomiais por *A. baumannii* através da análise genotípica reforça esses achados de relação clonal e permite o entendimento do processo de introdução de uma nova cepa em instituições hospitalares [76].

A epidemiologia molecular é uma abordagem particularmente importante para a determinação dos tipos genéticos de micro-organismos de relevância epidemiológica. Os métodos moleculares são considerados de maior acuidade para a tipagem de micro-organismos em estudos epidemiológicos, úteis na determinação do grau de similaridade e a distância genética entre diferentes amostras bacterianas [77]. As técnicas de biologia molecular apresentam diversas vantagens, como elevado poder discriminatório, ampla aplicação para várias espécies bacterianas e resultados rápidos. Dentre as metodologias atualmente disponíveis, denominadas “DNA *fingerprinting*”, destacam-se a ribotipagem, a eletroforese de pulsos alternados (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE), as técnicas baseadas na amplificação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* – PCR), que podem ser realizadas empregando-se iniciadores de sequência aleatórios (PCR-RAPD ou AP-PCR), entre outras [78].

Geralmente, considera-se que cepas que apresentam 100% de similaridade genética são consideradas indistinguíveis, cepas com mais de 90% de similaridade genética são consideradas relacionadas e as com similaridade genética inferior a 90% são consideradas distintas [76].

2.7.1 Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE

As principais técnicas genotípicas utilizadas baseiam-se na clivagem do DNA através de enzimas denominadas endonucleases de restrição. Em geral, um padrão de fragmentos idênticos ou bem semelhantes para todos os isolados do mesmo clone é obtido após a digestão do DNA, o que se explica pela elevada especificidade das enzimas utilizadas no processo. A quantidade e o tamanho dos fragmentos de DNA gerados após a clivagem da endonuclease de restrição variam com o sítio de ação da enzima. As endonucleases de baixa frequência geram uma menor quantidade de fragmentos com alto peso molecular que facilitam a interpretação, mas omitem pequenas diferenças [76]. Assim, esses fragmentos são separados por eletroforese. Fragmentos de baixo peso molecular podem ser separados por eletroforese convencional, mas fragmentos com tamanho superior a 50 kb necessitam de um campo elétrico para serem separados [79]. Através da análise do perfil de macro-restrição do DNA utilizando a PFGE, pode-se determinar o grau de similaridade entre as cepas de *A. baumannii*. A avaliação do padrão de bandas pode ser realizada através da análise visual da fotografia do gel ou da aquisição da imagem e posterior comparação utilizando um *software* que fornece o percentual de similaridade [80, 81].

2.7.2 Métodos de tipagem molecular baseados em PCR

Métodos de tipagem baseados em PCR possuem algumas vantagens: não necessitam de equipamentos especiais, são de fácil execução, têm menor custo, e propiciam maior rapidez na obtenção dos resultados. Entretanto, apresentam menor poder discriminatório e menor reprodutibilidade quando comparados com a PFGE [18, 76]. ERIC_PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*), AP-PCR (*arbitrarily primed*) e REP_PCR (*repetitive extragenic palindromic sequence*) têm sido os métodos baseados em PCR mais utilizados para a tipagem molecular de *Acinetobacter*. Eles se baseiam no mesmo princípio, que é a utilização de um ou mais *primers* capazes de amplificar regiões repetidas no DNA da bactéria [76, 79].

2.7.3 Ribotipagem

A técnica de ribotipagem foi desenvolvida por Grimont e Grimont em 1986, na qual se utilizava o plasmídeo recombinante pkk3535 como *primer*. Essa técnica consiste na extração e purificação do DNA total da bactéria, digestão desse material com uma enzima de restrição, corrida eletroforética, transferência de fragmentos desnaturados para um filtro, hibridação com a sonda marcada e revelação do padrão de bandas. Vários métodos têm sido descritos na literatura para a realização da ribotipagem.

A sensibilidade da ribotipagem em agrupar ou não espécies bacterianas, em linhagens específicas, está diretamente relacionadas ao tipo de endonuclease de restrição empregada. Para a clivagem do DNA de *Acinetobacter baumannii* a enzima de restrição utilizada é a *EcoRI* e pode conferir um poder discriminatório comparável ao PFGE [82].

A ribotipagem é um método altamente reprodutível, pode ser utilizada para tipificação de todos os micro-organismos e permite uma avaliação objetiva dos resultados. Tem a vantagem de poder ser utilizada com fins taxonômicos e pode identificar *Acinetobacter* em nível de grupos de DNA. Outra vantagem é a sua fácil execução e rapidez. As principais desvantagens dessa técnica são os elevados custos do equipamento, reagentes e da manutenção. É a técnica mais cara quando comparada com PFGE e PCR[83].

2.8 MORTALIDADE ASSOCIADA AO ACINETOBACTER

A mortalidade associada à colonização ou infecção por *A. baumannii* é um tópico controverso. Embora vários estudos atribuam ao *A. baumannii* uma mortalidade considerável, outros argumentam que os pacientes colonizados/infectados por esse agente são, de forma habitual, gravemente enfermos, sendo o desfecho influenciado por muitas variáveis que não a própria bactéria [84]. Estudos têm evidenciado grandes diferenças nas taxas de mortalidade associada ao *A. baumannii*, variando de 5% a 54% [54]. Provavelmente essa

diversidade decorre do grau de virulência da cepa, gravidade do paciente e topografia da infecção [85-87].

2.9 TRATAMENTO

O tratamento das infecções causadas por CRAB tem sido particularmente difícil, sendo que, atualmente, as opções terapêuticas se restringem às polimixinas, à tigeciclina e à ampicilina-sulbactam. Como mencionado acima, em geral esses micro-organismos são resistentes aos β -lactâmicos, bem como às fluorquinolonas e aminoglicosídeos. Por fim, ainda que esta classe permaneça como a opção terapêutica ideal, a sensibilidade aos carbapenêmicos tem sido cada vez mais incomum.

2.9.1 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos (imipenem, meropenem e doripenem, o último ainda não disponível no Brasil), β -lactâmicos de amplo espectro, são as principais drogas utilizadas para tratamento de infecções graves causadas pelo *A. baumannii*, por serem as mais eficazes [88]. Entretanto, nos últimos anos, o aumento de isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos tem sido relatado mundialmente. Dessa forma, essas drogas têm sido utilizadas para o tratamento de CRAB como parte de terapias combinadas [3, 88].

2.9.2 Polimixinas

As polimixinas (polimixina B e polimixina E ou colistina) têm sido os ATM mais frequentemente utilizados para tratamento das infecções por cepas MDR de *A. baumannii*. Descobertas em 1947, esse grupo de peptídeos policatiônicos foi isolado

de *Bacillus*. Atuam através da alteração na permeabilidade da membrana citoplasmática, causando a morte bacteriana, sendo bactericidas *in vitro* [11].

A colistina é a mais amplamente utilizada e estudada. Mas estudos de farmacocinética e farmacodinâmica da polimixina B são limitados. Um estudo comparando as duas formulações no tratamento de infecções graves por CRAB evidenciou similaridades relacionadas à eficácia e toxicidade [89]. Devido à nefrotoxicidade e neurotoxicidade, essas drogas foram usadas com restrição a partir da década de 1980. Entretanto, estudos recentes têm evidenciado níveis de toxicidade mais baixos quando comparamos aos estudos prévios [18].

Os níveis de eficácia clínica das polimixinas variam de 55% a maior que 80%, dependendo do estudo, e parecem ser semelhantes àqueles de outros ATM. Estudos observacionais apresentam níveis de cura com colistina de 57% a 77% para tratamento de infecções graves por *A. baumannii* (pneumonias, bacteriemias, infecções intra-abdominais e infecções do sistema nervoso central) [90]. Levin *et al.*, evidenciaram 67% de cura das infecções com o uso da polimixina, sendo os piores resultados (25%) evidenciados nos pacientes com pneumonia causada por bastonetes de coloração negativa ao Gram, com perfil MDR [91].

Apesar da limitação da disponibilidade de dados de qualidade em relação à farmacocinética e farmacodinâmica das polimixinas, há relatos de que a colistina apresenta distribuição ruim nos pulmões e no sistema nervoso central (SNC), e que os resultados de eficácia variam de acordo com os diferentes sítios de infecção [91].

A polimixina pode ser usada em sinergismo com imipenem, azitromicina e rifampicina, mas nenhum ensaio clínico apresentou superioridade da terapia combinada em relação à monoterapia com a polimixina [11].

Resistência às polimixinas tem sido relatada. Entretanto, a maioria das cepas de CRAB mantém elevada sensibilidade a essas drogas. Dados do programa SENTRY, de isolados de *A. baumannii*, encontraram sensibilidade à polimixina de 97,9% [59].

2.9.3 Tigeciclina

A tigeciclina é uma glicilciclina (derivado semi-sintético da minociclina) que possui atividade bacteriostática contra algumas cepas de *A. baumannii* MDR. Atua através da inibição da síntese protéica celular, ao se ligar à subunidade 30S do ribossoma bacteriano [18]. Atualmente a tigeciclina é licenciada apenas para tratamento de infecções de pele e tecidos moles e infecções intra-abdominais graves. Entretanto, essa droga tem sido utilizada para tratamento de pneumonia e infecção da corrente sanguínea causada por CRAB, com resposta clínica muito variável [18, 92].

Apesar de ser potencialmente uma opção terapêutica nos casos de infecção por CRAB, existem algumas limitações à sua utilização, como o ponto de corte de sensibilidade ainda não determinado pelo CLSI, a concentração sérica sub-ótima (devido à sua rápida difusão nos tecidos) para o tratamento de micro-organismos com CIM de 1–2µg/ml, e a escassez de dados clínicos publicados [88, 93].

Por fim, resistência de alto nível tem sido descrita para alguns isolados de *Acinetobacter* MDR, secundária à hiper-regulação da bomba de efluxo mediada por cromossoma. Por essa razão, a tigeciclina tem sido resguardada para terapia de resgate, com indicação restrita [22].

2.9.4 Ampicilina-Sulbactam

O sulbactam possui uma grande atividade bactericida intrínseca contra muitas cepas de *A. baumannii*. No Brasil, este inibidor de β-lactamase é comercializado em associação com ampicilina. Tratamentos com ampicilina-sulbactam têm evidenciado resposta clínica semelhante a outros regimes para pneumonia e infecção da corrente sanguínea, considerando-se as capas sensíveis de *A. baumannii* [88].

A susceptibilidade do *A. baumannii* a esse ATM é variável, dependendo da região geográfica. Infelizmente, a resistência é muito comum em determinadas regiões, fato que limita muito seu uso para tratamento de infecções por *A. baumannii* [18]. Um estudo brasileiro descreveu pacientes com infecção grave pelo

Acinetobacter tratados com ampicilina-sulbactam, no qual ocorreu boa resposta clínica, sugerindo que essa possa ser uma escolha terapêutica, mesmo sendo necessária a elevação das doses habituais [94].

2.9.5 Terapia combinada

O uso de terapia combinada para o tratamento de CRAB tem se tornado uma área de grande interesse. Várias combinações com carbapenêmicos, sulbactam, tobramicina, amicacina, colistina, rifampicina e aztreonam têm sido estudadas tanto *in vitro* como *in vivo*, mostrando resultados variados [95]. Os resultados dessas investigações ainda são limitados, o que limita a recomendação do uso de combinações específicas para o tratamento de infecções por CRAB. Entretanto, terapia combinada deve ser considerada para o tratamento de infecções graves em pacientes com opções terapêuticas limitadas, a fim de se obter sinergismo entre as drogas, maximizando a eficácia terapêutica e possivelmente reduzindo o risco de emergência de resistência [17].

3 JUSTIFICATIVA

O *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB) foi identificado pela primeira vez no Hospital das Clínicas/UFMG (HC/UFMG) em dezembro de 2003 e, desde então, tem sido identificado em diferentes setores da instituição. Assim, a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) tem estabelecido atividades de vigilância e controle, considerando a importância epidemiológica dessa cepa. A Unidade de Terapia Intensiva e Coronariana (UTIC), setor onde estiveram internados os indivíduos estudados neste trabalho, foi inaugurada em maio de 2009, e representa uma unidade destinada ao atendimento de dois perfis de pacientes adultos: pacientes coronariopatas (10 leitos), e pacientes portadores de outras patologias clínicas graves (8 leitos). Adicionalmente, pacientes cirúrgicos também são, por vezes, internados na Unidade.

Desde a abertura da UTIC, um número crescente de pacientes colonizados/infectados por CRAB tem sido observado. Apesar das medidas de controle desenvolvidas pela CCIH em conjunto com a equipe assistencial, o CRAB tornou-se um patógeno endêmico, sendo atualmente um dos principais micro-organismos multidrogaresistentes (MDR) identificado nesta unidade, e o 2º causador de bacteriemia (dados da CCIH-HC/UFMG, 2011).

Diante do exposto, considerou-se relevante a proposta de um estudo visando caracterizar pacientes internados na UTIC e que tenham sido colonizados e/ou infectados pelo *A. baumannii*. A idéia foi a de aliar a descrição clínica dos pacientes à caracterização fenotípica e genotípica das cepas bacterianas estudadas.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Estudar as características microbiológicas de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes ao imipenem isoladas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva, procedendo à descrição clínico-epidemiológica dos portadores.

4.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil clínico-epidemiológico dos pacientes colonizados ou infectados por cepas de *Acinetobacter* resistente aos carbapenêmicos, internados em uma unidade de terapia intensiva;
- Caracterizar o perfil fenotípico de susceptibilidade a antibióticos apresentado pelas cepas de *Acinetobacter* resistente aos carbapenêmicos estudadas;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de imipenem, polimixina B e tigeciclina das cepas estudadas, através de testes quantitativos;
- Investigar a presença de carbapenemases (metalo- β -lactamases e oxacilinases) nas cepas estudadas;
- Avaliar o perfil de clonalidade entre as cepas estudadas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo de observação, descritivo, transversal, envolvendo pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva e Coronariana (UTIC) do Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG) no período de dezembro de 2009 a dezembro de 2010, e cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (CRAB) deles isoladas.

5.2 CASUÍSTICA

Todos os pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, que estiveram internados na UTIC no período do estudo e nos quais ocorreu isolamento de CRAB foram considerados para inclusão no estudo. Nos pacientes que apresentavam mais de um isolado de CRAB obtidos durante a internação na UTIC e armazenados para estudo, optou-se pelo isolado proveniente de amostra com maior valor clínico, ou, se fossem todas amostras de vigilância, a escolha foi aleatória.

Os dados demográficos, clínicos e epidemiológicos referentes aos pacientes portadores das cepas de *A. baumannii* incluídas no estudo foram obtidos através de consulta a prontuários da instituição sede do estudo, e a partir de informações fornecidas pela equipe médica assistente. Informações adicionais foram coletadas junto aos arquivos da CCIH do HC-UFMG. O formulário de coleta de dados encontra-se no APÊNDICE A.

As seguintes variáveis foram consideradas neste estudo:

- Idade;
- Sexo;
- Tipo de internação (clínica, cirurgia eletiva ou cirurgia de urgência/emergência);
- Tempo de permanência (UTIC e hospitalar);
- Categoria diagnóstica: cardiovascular, choque (exceto sepse), neurológico, cuidados paliativos, infecção/sepse, renal, trato gastrointestinal, insuficiência respiratória, endocrinológica, cuidados paliativos, onco-hematológica, monitoração, pós-parada cardio-respiratória, gineco-obstétrico, outras patologias clínicas;
- Comorbidades /fatores de risco para infecção por CRAB: internação prévia, internação prévia em CTI, doença onco-hematológica, neoplasia sólida, uso de imunossupressor, antibioticoterapia prévia, corticoide, diabetes *mellitus*, insuficiência renal crônica (IRC) não dialítica, IRC dialítica, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), insuficiência cardíaca, insuficiência hepática;
- Uso de procedimentos invasivos prévios à identificação de CRAB: ventilação mecânica, cateter vascular central, sondagem vesical de demora;
- Uso de antibioticoterapia (durante a internação) anterior à identificação de CRAB: cefalosporinas 3ª e/ou 4ª geração, fluorquinolona, inibidores de β -lactamases, carbapenêmicos ou vancomicina;
- Tipo de identificação do CRAB: colonização e/ou infecção;
- Tipo de classificação da IH: diagnóstico epidemiológico (NHSN), clínico ou ambos;
- Sítio de infecção: sepse sem foco, infecção de cateter, pneumonia, infecção do trato urinário (ITU), intra-abdominal, pele e/ou partes moles, infecção do sítio cirúrgico (ISC), outros focos (com ou sem bacteriemia);
- Condições clínicas durante a internação na UTIC: categoria de APACHE II - *Acute Physiologic and Chronic Health Evaluation*, uso de ventilação mecânica (VM), uso de ventilação não invasiva (VNI), instabilidade hemodinâmica, uso de aminas vasoativas;
- Evolução do paciente: alta hospitalar, transferência, óbito na UTIC e óbito hospitalar.

5.3 INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS NO ESTUDO

As instituições participantes e os respectivos setores envolvidos neste estudo, assim como os procedimentos realizados em cada um deles são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 – Procedimentos realizados pelas instituições participantes do estudo.

Instituição	Procedimento
Unidade de Terapia Intensiva e Coronariana do HC/UFMG	Inclusão de pacientes e obtenção de amostras microbiológicas
Setor de Microbiologia da Unidade Funcional de Patologia e Medicina Laboratorial (UFPML) do HC/UFMG	Identificação bacteriana, avaliação do antibiograma pela técnica de Kirby-Bauer e congelamento das cepas para encaminhamento ao laboratório de referência no ICB/USP
Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP)	Avaliação da concentração inibitória pelo método de diluição em ágar Pesquisa de β -lactamases Avaliação de epidemiologia molecular pelo ERIC-PCR

5.4 DEFINIÇÕES

- Infecções Hospitalares (IH): foram definidas conforme critérios de notificação (NHSN-CDC) utilizados pela CCIH do HC/UFMG, considerando a topografia de isolamento do micro-organismo.
- IH por diagnóstico clínico: aquela na qual o médico assistente fez o diagnóstico do processo infeccioso e iniciou terapia antibiótica, visando o tratamento da infecção por CRAB.
- Terapia antibiótica prévia: utilização de no mínimo 72 horas do antimicrobiano durante a internação índice avaliada neste estudo, e antes do isolamento da cepa de CRAB motivadora da sua inclusão no mesmo.

- Coeficiente de DICE (CD): Utilizado para comparação visual de similaridade genética. Este coeficiente foi descrito por Dice [96] e é obtido pela fórmula:

$$CD = 2(na=b) / (na + nb)$$

sendo:

$na=b$, o número de fragmentos localizados na mesma posição, em ambas as amostras;

$na + nb$, número total de fragmentos apresentados por ambas as amostras.

O valor encontrado do CD pode definir se as amostras são idênticas, similares ou diferentes (Quadro 3).

Quadro 3 – Avaliação da similaridade genética entre linhagens bacterianas utilizando o coeficiente de DICE (CD).

Padrão	CD	Observação
Idêntico	1,00	Todas as bandas iguais
Similar	0,90 a 0,99	A maioria das bandas iguais
Diferente	< 0,90	Raras bandas iguais

5.5 MATERIAL

As amostras microbiológicas incluídas nesse estudo foram coletadas mediante solicitação médica para investigação de possíveis infecções (amostras clínicas), ou seguindo protocolo de pesquisa de colonização institucional elaborado pela CCIH deste hospital (suabes de vigilância).

Os pacientes admitidos na UTIC são rotineiramente submetidos à pesquisa de colonização, através da coleta de suabes nasal e perianal, segundo protocolo estabelecido pela CCIH:

- À admissão: (i) naqueles pacientes que procedem de outras instituições de saúde, independente do tempo de permanência no serviço de origem; (ii) nos pacientes que foram transferidos de outras unidades do HC e apresentam história de internação igual ou superior a sete dias.
- No sexto dia de internação: todos os pacientes internados na UTIC

- Na ocasião da alta da UTIC: todos os pacientes que tenham permanecido na UTIC por período superior a três dias e/ou que tenham sido submetidos a transplante de células-tronco hematopoéticas ou de órgão sólido durante a mesma internação hospitalar.

5.6 MÉTODO

5.6.1 Coleta e processamento das amostras biológicas

Todas as cepas de CRAB incluídas neste estudo encontravam-se armazenadas em geladeira após o isolamento inicial, e foram recuperadas seguindo-se os procedimentos rotineiros da microbiologia convencional realizada no Setor de Microbiologia, Unidade Funcional de Patologia e Medicina Laboratorial (UFPML) do HC/UFGM. Após o plantio primário da amostra realizou-se o isolamento da cepa, identificação e teste de susceptibilidade por automação (VITEK II[®] – *bioMérieux*), segundo a rotina do Laboratório de Microbiologia. Em algumas situações, quando há contaminação ou divergência entre a avaliação do microbiologista e o resultado do VITEK utiliza-se testes bioquímicos convencionais para a identificação do micro-organismo. Realizou-se antibiograma manual através de técnica disco difusão em ágar (Kirby-Bauer) para todos os casos de isolamento de *A baumannii*. Após o reconhecimento da resistência ao imipenem e meropenem através de antibiograma, as cepas CRAB foram repicadas em ágar sangue, e colônias isoladas foram selecionadas e transferidas para criotubos de 1,5 mL de capacidade, contendo meio de sais minerais acrescido de 10 % v/v de glicerol e mantidas por criopreservação a -20° C, conforme protocolo de congelamento de cepas utilizado no Setor de Microbiologia, para envio a laboratório de referência.

No Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas (ICB-USP), coordenado pelo Prof. Nilton Lincopan, foi realizada nova pesquisa de resistência ao imipenem através de técnica de diluição em ágar e, em alguns casos, confirmação por meio de E-test[®]. Nos casos em que essa resistência foi confirmada, realizaram-se testes fenotípicos (Dupla difusão de disco e E-test[®] para pesquisa de

M β L) e genotípicos (PCR para identificação de M β L e Oxacilinas) para avaliação do mecanismo de resistência, além de ERIC-PCR para avaliação de perfil de clonalidade.

5.6.1.1 Teste de sensibilidade qualitativo

O perfil de sensibilidade antimicrobiano foi avaliado pelo método de difusão de discos em ágar (Kirby-Bauer) empregando-se discos comerciais impregnados com antimicrobianos, seguindo as normas padronizadas pelo CLSI, documento M2-A10 (2009 e 2010), e empregando-se cepas padrões ATCC (*American Type Culture Collection*) para o controle de qualidade. Os antimicrobianos testados foram os utilizados nos esquemas terapêuticos convencionais para os casos de infecções por *A. baumannii*. A escolha dos antimicrobianos seguiu o procedimento padrão do Laboratório - Setor de Microbiologia, da CCIH e da Farmácia do HC/UFMG, que se baseia na normalização do CLSI, documento M100-S (revisada anualmente), atual M100-S21 (2011). Foram avaliados os seguintes antimicrobianos: amicacina (30 μ g), aztreonam (30 μ g), cefepime (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), gentamicina (10 μ g), imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g), ampicilina-sulbactam (10/10 μ g), piperacilina-tazobactam (100/10 μ g), sulfametoxazol-trimetoprim (1.25/23.75 μ g) (CEFAR®).

As placas foram mantidas em estufa controlada a 35 °C \pm 2°C, e após 16 a 18 horas, foi feita a leitura das zonas de inibição, com diâmetros medidos em milímetros, usando luz direta e não refletida. Para determinar a sensibilidade ou a resistência às drogas empregadas, o tamanho dos halos obtidos foi comparado com tabela própria, de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI, documento M100-S19 (2009) ou M100-S20 (2010).

5.6.1.2 Teste de sensibilidade quantitativo

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do imipenem foi realizada empregando-se o método de diluição em ágar de acordo com as normas do CLSI, 2011.

Foram realizadas diluições seriadas dos antimicrobianos, considerando concentrações utilizadas no ponto de corte interpretativo de sensibilidade e resistência. Como exemplo, para o imipenem foram contempladas concentrações finais de 512 µg/mL a 0,03 µg/mL. Um mililitro de cada diluição do antimicrobiano foi misturado com 19 mL de ágar Muller-Hinton (diluição 1:20), estocados em tubos previamente esterilizados e estabilizados em uma temperatura entre 45° a 50°C.

Após homogeneização, o conteúdo de cada tubo contendo a respectiva diluição de cada antimicrobiano foi depositado em placas de Petri estéreis.

O inóculo bacteriano foi preparado pelo crescimento do isolado em 3 mL de caldo Mueller-Hinton, os quais foram incubados a 37°C durante duas a três horas. O inóculo foi ajustado para atingir a escala 0,5 de McFarland, que corresponde a uma turbidez entre 0,8 e 1,0 de absorvância em uma longitude de onda de λ 625 nm, na qual a bactéria encontra-se na fase de crescimento exponencial.

Para realizar o ensaio, a suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland foi diluída em caldo Mueller-Hinton estéril na proporção de 1:10 que resultou num inóculo de aproximadamente 10^7 UFC/ml, e 300 µL dessa suspensão foram transferidos para o multi-inoculador de Steer (Figura 4). Posteriormente, foram inoculados de 1 a 3 µL de cada amostra no ágar contendo as diferentes concentrações dos antimicrobianos testados, atingindo assim uma concentração bacteriana final de 10^4 UFC/mL (CLSI). As placas foram incubadas entre 18 a 20 horas. A CIM foi considerada a menor concentração do antibiótico em que não ocorreu crescimento visível da cepa e foram lidas de acordo com os critérios de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI para *A. baumannii* (CLSI, 2011). Como controle utilizou-se as cepas padrão de *A. baumannii* ATCC 19606 e *E. coli* ATCC 25922.

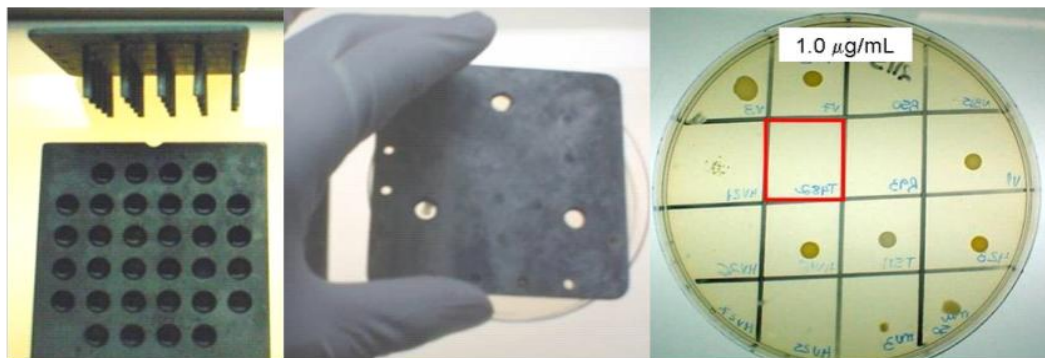


Figura 4 – Determinação da CIM utilizando o método de diluição em ágar. Os inóculos bacterianos foram depositados em cada placa de ágar MH contendo uma concentração determinada com o respectivo antimicrobiano, com ajuda de um aplicador de Steers. As placas foram incubadas a 37°C e a leitura da CIM foi interpretada como a menor diluição do antimicrobiano que inibiu o crescimento macroscopicamente visível. No quadro vermelho pode ser visualizada a determinação da CIM para polimixina B, para uma cepa estudada (CIM = 1,0 µg/mL).

Alguns resultados foram confirmados utilizando fitas de E-test[®], que consiste numa fita plástica contendo gradientes de concentrações do antimicrobiano testado (Figura 5).

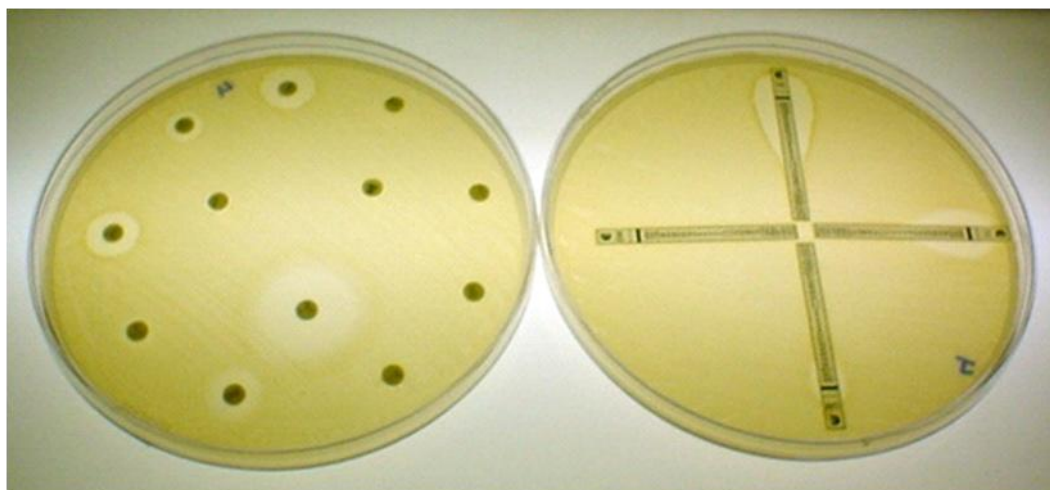


Figura 5 – Determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana utilizando o método de disco-difusão e E-test[®].

5.6.1.3 Pesquisa de carbapenemases (Triagem: dupla-difusão e E-test[®])

A triagem para a produção de M β L foi realizado mediante sinergismo com o teste de dupla difusão de disco, segundo as recomendações do CLSI de Arakawa *et al*[97] . As suspensões bacterianas de cada isolado em caldo Mueller-Hinton foram ajustadas à escala 0,5 McFarland e semeadas em ágar Mueller-Hinton com suabe estéril. Foram dispensados na placa discos de papel filtro, impregnados com 5 μ L de cada inibidor enzimático (EDTA 0,5 M, ácido 2-mercaptoacético e ácido 2-mercapropiônico) e foram alinhados a 2 cm dos discos com os substratos imipenem (IMP, 10 μ g - OXOID, Cambridge, UK) e ceftazidima (CAZ, 30 μ g - OXOID, Cambridge, UK). Foram ainda dispensados na placa discos de antibióticos impregnados com 5 μ L de cada inibidor enzimático. As placas foram mantidas em estufa controlada a 37°C, e após 16 a 18 horas foi realizada a leitura das zonas de inibição, com diâmetros medidos em milímetros, usando luz direta e não refletida, e adicionalmente foi verificado o aparecimento de zonas fantasmas entre os discos de CAZ e IMP e discos contendo inibidores. Como controle foi utilizada a cepa de *P. aeruginosa* produtora de M β L SPM-1 (Pa48/1997A).

Para o E-test[®] M β L, o preparo e a inoculação da suspensão bacteriana foram realizados da mesma maneira que no método anterior. Em seguida a fita foi dispensada na placa. A detecção de M β L foi determinada de acordo com os critérios propostos por Walsh *et al.* (2002) [98]. O teste para detecção de M β L consiste numa fita plástica contendo gradientes de concentrações de imipenem de 4 a 256 μ g/mL (IPM) de um lado da tira e gradientes de IPM+EDTA de 1 a 64 μ g/mL (IPI) na outra extremidade. O teste foi considerado positivo caso fosse observada uma redução na CIM \geq 3 log ou IPM/IPI \geq 8 [98].

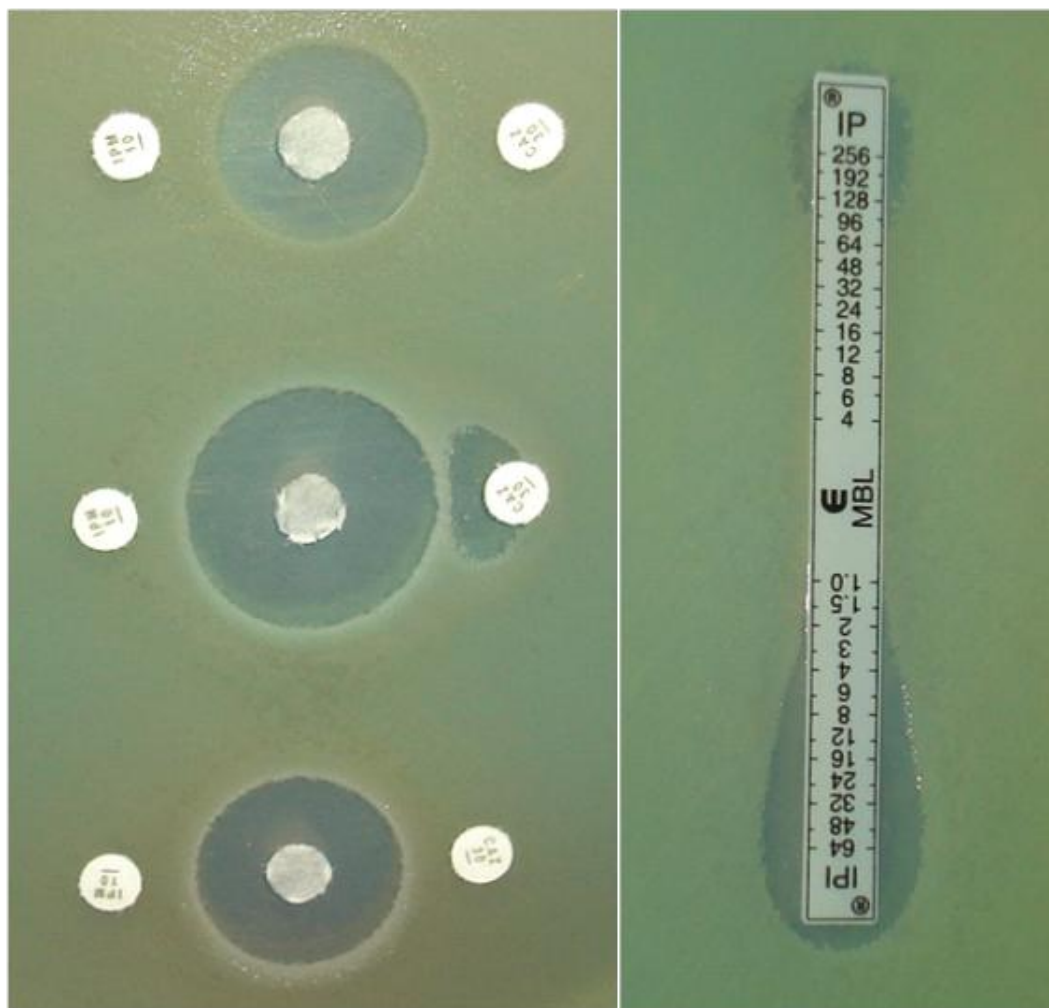


Figura 6 – Pesquisa de M β L utilizando o método de disco-aproximação e Etest[®] M β L (imipenem-imipenem EDTA). Cepa controle de *P. aeruginosa* (48/1997A) apresentando resultado positivo para M β L utilizando disco contendo ácido 2-mercapopropiônico. A CIM do imipenem na presença de EDTA foi reduzido desde 128 para 2 μ g/mL.

5.6.1.4 Biologia molecular

Para extração do DNA total foi utilizado o método de fervura. A partir de uma cultura em caldo Mueller Hinton, alíquotas de 1 mL foram submetidas à centrifugação por 1 minuto. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi resuspenso em 100 μ L de água milli-Q estéril. Os microtubos contendo os *pellets* resuspenso foram fervidos durante 10 minutos e mantidos em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, foram centrifugados por 15 minutos. Finalmente, 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para um microtubo estéril, mantido a -20°C .

Como controle interno de extração, as amostras obtidas foram submetidas a PCR utilizando-se os *primers*: 11E 5'-GAGGAAGGTGGGGATGACGT-3' e 13B 5'-AGGCCCGGGAACGTATTTCAC-3', para pesquisa da subunidade de DNA ribossômico 16S.

A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando o Kit NucleoSpin[®], baseado no método da lise alcalina. A partir de uma cultura em caldo LB *overnight*, alíquotas de 3 mL foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspenso em 250 µL de solução I (glicose 50Mm, Tris-HCl 25mM, EDTA 10Mm, Rnase) gelada. Após homogeneização, foram adicionados 250 µL da solução II (0.2N NaOH, SDS 1%) e o tubo mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 300 µL de solução neutralizante, para deter a lise alcalina. Após centrifugação por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para a membrana de sílica para uma nova centrifugação. Posteriormente o *pellet* foi lavado com etanol e centrifugado por 1 minuto e novamente por 2 minutos para secar a membrana. Utilizando-se uma solução de eluição, o DNA plasmidial foi removido da membrana e estocado a -20° C.

A confirmação genética dos determinantes de resistência foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para amplificar os genes de MβL: *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{VIM-like}; os genes de OXA: *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-143-like}; e os genes de mobilização IS*Aba*1, IS*Aba*3 (Quadro 4). Os ensaios de PCR foram realizados no termociclador Gene Amp PCR System 2400 e a amplificação foi realizada nos seguintes parâmetros: desnaturação de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguidos de extensão final de 72°C por 5 minutos. A temperatura de anelamento foi de 50°C por 30 segundos.

Após amplificação, os produtos do PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando tampão TBE. Foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb, como padrão (Figura 7). O gel foi corado com brometo de etídio e posteriormente visualizado em transluminador UV.

Quadro 4 – Alvos amplificados para a detecção de genes *bla*_{OXA}, *bla*_{MβL} e IS.

Alvo	Primer	Sequência oligonucleotídica	Tamanho amplicon
<i>Primers utilizados para detecção de genes codificadores de MβL</i>			
<i>bla</i> _{VIM-like}	VIM like-F	5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3'	~ 600 pb
	VIM like-R	5'-GAATGCGCAGCACCAGGAT-3'	
<i>bla</i> _{IMP-like}	IMP 1-F	5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC-3'	~ 700 pb
	IMP 1-R	5'-GAACAACCAGTTTTGCCTTACC-3'	
	IMP 2-F	5'-GTTTTATGTGTATGCTTCC-3'	~ 700 pb
	IMP 2-R	5'-AGCCTGTTCCCATGTAC-3'	
<i>Primers utilizados para detecção de genes codificadores de OXA e ISAb_a</i>			
<i>bla</i> _{OXA-51}	OXA-51 r	5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'	~ 352 pb
	OXA-51 f	5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3'	
<i>bla</i> _{OXA-58}	OXA-58 r	5'-CC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3'	~ 597 pb
	OXA-58 f	5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3'	
<i>bla</i> _{OXA-23}	OXA-23 r	5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'	~ 501 pb
	OXA-23 f	5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3'	
<i>bla</i> _{OXA-24}	OXA-24 r	5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3'	~ 248 pb
	OXA-24 f	5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3'	
<i>bla</i> _{OXA-143}	OXA-143 r	5'-TAATCTTGAGGGGGCCAACC-3'	~ 149 pb
	OXA-143 f	5'-TGGCACTTTCAGCAGTTCCT-3'	
<i>ISAb_a1</i> <i>bla</i> _{OXA-51}	<i>ISAb_a1</i> r inv	5'-GTG TCA TAG TAT TCG TCG-3'	~ 359 pb
	OXA-51 f inv	5'-CAA GGC CGA TCA AAG CAT TA -3'	
<i>ISAb_a1</i>	<i>ISAb_a1</i> r	5'-CGA CGA ATA CTA TGA CAC-3'	~ 548 pb
	<i>ISAb_a1</i> f	5'-CAC GAA TGC AGA AGT TG-3'	

Fonte: Banco de genes da *National Library of Medicine* (BLAST).

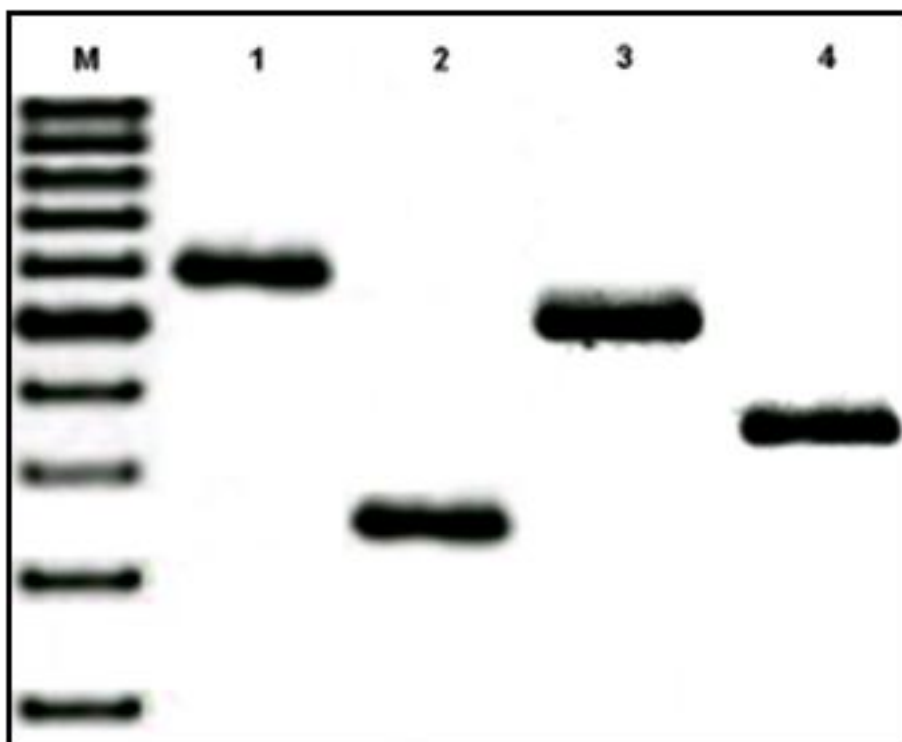


Figura 7 – Reação de PCR para detecção dos genes codificadores das enzimas OXA. M: Marcador de Peso Molecular 100 pb; 1: OXA-58 (597 pb); 2: OXA-72 (248 pb); 3: OXA-23 (501 pb); 4: OXA-51 (352 pb).

Posteriormente à eletroforese, o produto do PCR foi excisado do gel de agarose e purificado com o *kit* “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*”, de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria a 260 nm em *nanodrop* com posterior envio para sequenciamento. O resultado foi comparado com as bases de dados disponíveis no BLAST (*National Center For Biothechnology Information, 2008*).

A amplificação dos segmentos conservados presentes no DNA bacteriano foi realizada por meio do método de ERIC PCR. As regiões conservadas do DNA das cepas foram amplificadas pela técnica de PCR a partir do *primer* único ERIC-2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC-3' [99], específico para estes segmentos. A reação de amplificação apresentou os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguida da etapa de amplificação com 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridação a 52°C por 1 minuto, etapa de extensão a 72°C por 8 minutos e extensão final a 72°C por 16 minutos. A visualização dos segmentos foi obtida por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com GelRed™ (Uniscience)

e posteriormente visualizado em transluminador UV. A clonalidade foi avaliada a partir do perfil de amplificação, utilizando o coeficiente DICE, em uma tolerância de 2%. As porcentagens de similaridade assim como os cálculos de *cluster* e a subsequente geração de dendrograma foi realizadas no *software* Bionumerics.

5.7 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais e submetido às determinações da Resolução CNS 196/96, bem como às normas complementares da Resolução 347/05, com o parecer nº ETIC 0215.0.203.000-10 de 22 de setembro de 2010.

Considerando-se que o trabalho foi uma avaliação retrospectiva de materiais biológicos previamente coletados dos pacientes através da rotina institucional, e que os mesmos permaneceram armazenados no Setor de Microbiologia do Laboratório Central para possíveis análises da CCIH-HC/UFMG, não acarretou nenhum procedimento ou risco adicional para os pacientes.

5.8 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FORMATAÇÃO

A pesquisa bibliográfica foi realizada a partir de consulta a base de dados Medline compilada pela *National Library of Medicine*, dos Estados Unidos da America, disponível na internet.

A estrutura da dissertação seguiu o estilo de Vancouver.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A amostra estudada foi de conveniência. Os dados coletados foram digitados em banco de dados especificamente criado para este estudo, no *software* Microsoft Office Excel[®], e analisados no *software* Statistical Package Social Science (SPSS[®]) versão 15.0 (Chicago, Illinois). As características clínicas e epidemiológicas dos pacientes estudados foram apresentadas de forma descritiva. Para essa análise, assim como para análise descritiva microbiológica foram utilizadas medidas de tendência central (média e mediana) e dispersão (desvio-padrão) das variáveis contínuas e de frequência e percentual para variáveis categóricas. Para análise comparativa, foi utilizado teste qui-quadrado (X^2) ou teste exato de Fisher como medidas de associação para variáveis categóricas. Para comparação de variáveis contínuas, utilizou-se o teste T ou o teste de Mann-Whitney, conforme indicado pela normalidade ou anormalidade da distribuição dos dados.

Em todas as análises foi considerado o nível de significância estatística quando $p \leq 0,05$ bilateral, e intervalo de confiança de 95%.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

No período avaliado foram admitidos 867 pacientes na UTIC, dos quais 84 (9,7%) tiveram isolamento de CRAB pelo menos uma vez em algum material biológico que tenha sido coletado durante sua permanência na Unidade. Desse total, foram armazenadas 56 cepas de pacientes distintos, das quais 43 foram submetidas à análise microbiológica adicional (Figura 8).

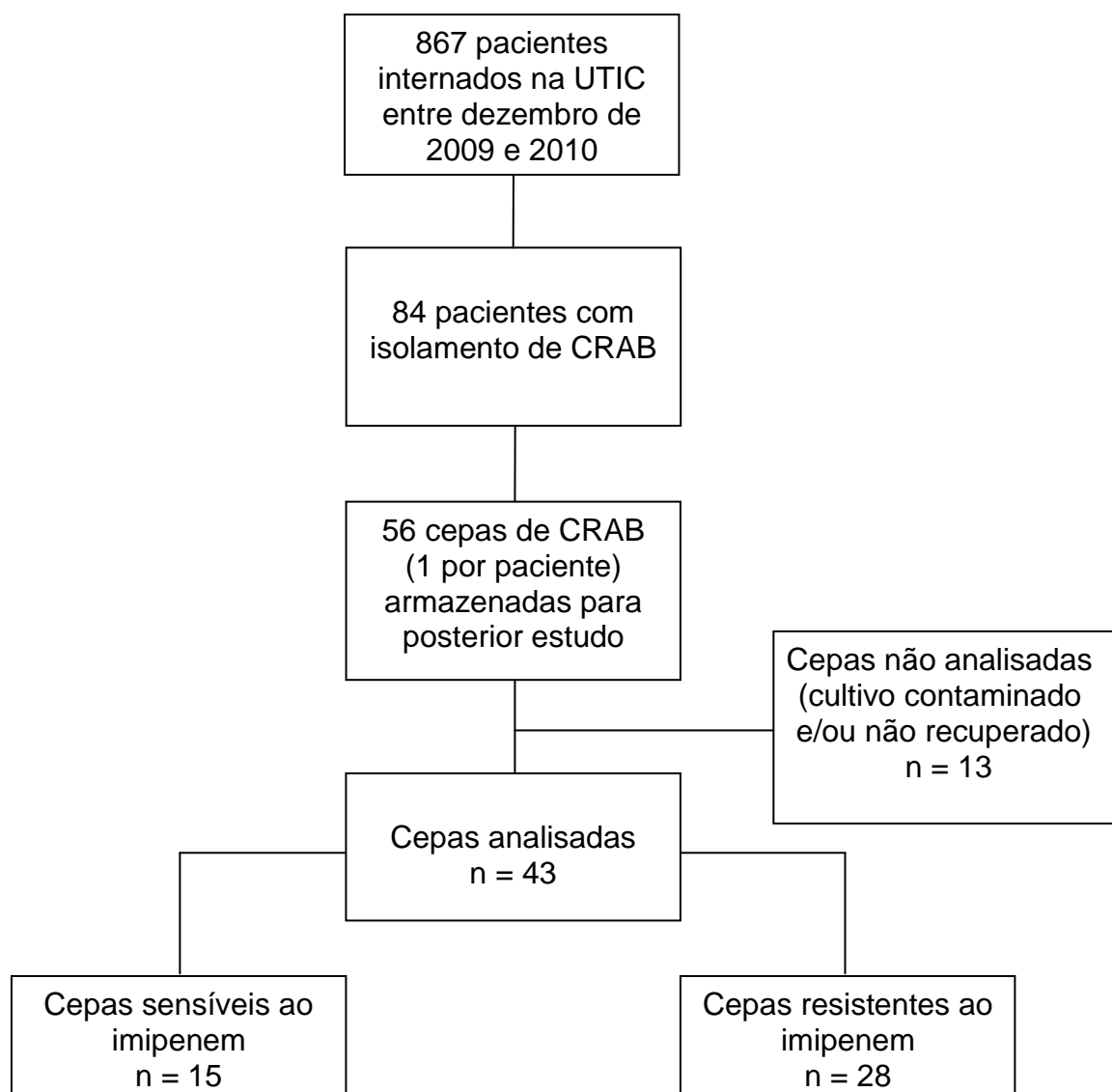


Figura 8 – Destinação das cepas de *A. baumannii* isoladas de pacientes internados na UTIC do HC/UFMG.

Considerando-se a avaliação clínico-epidemiológica dos 56 pacientes portadores de CRAB incluídos no estudo tem-se que 33 (58,9%) eram do sexo masculino, e a idade média era de 61 anos ($\pm 15,1$). A média de permanência dos pacientes na UTIC foi de 18,7 dias ($\pm 16,5$) e a duração média de permanência no HC foi de 36,9 dias ($\pm 28,7$). O valor mediano do escore de APACHE II, medido à admissão na UTIC foi igual a 15 (1-32) (Tabela 1).

Tabela 1 – Idade, tempo de internação e escore APACHE II de 56 pacientes portadores de CRAB internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010.

Característica	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Idade	61,0	63,5	15,1	20	88
Permanência no HC/UFMG	36,9	29,5	28,7	4	136
Permanência na UTIC	18,7	15,5	16,5	3	97
APACHE II	14,3	15,0	6,0	1	32

Quanto ao tipo de internação, 40 pacientes (71,4%) apresentavam patologias clínicas. Os quadros de infecção/sepse (n=37 ou 66,1%), patologias cardiovasculares (n=18 ou 32,1%) e insuficiência respiratória (n=14 ou 25%) foram as categorias diagnósticas mais frequentes à admissão. Entretanto, alguns pacientes pertenciam a mais de uma categoria diagnóstica (Tabela 2).

Tabela 2 – Tipo de internação e categoria diagnóstica de 56 pacientes portadores de CRAB internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010.

Parâmetro	n	%
TIPO DE INTERNAÇÃO		
Clínica	40	71,4
Cirúrgica	16	28,6
CATEGORIA DIAGNÓSTICA		
Cardiovascular	18	32,1
Clínica (outras)	3	5,4
Hemato-oncológico	2	3,6
Hepático	4	7,1
Infecção / sepse	37	66,1
Insuficiência respiratória	14	25,0
Neurológico	6	10,7
Pós-Parada Cárdio-Respiratória	1	1,8
Renal	1	1,8
Trato gastrintestinal	3	5,4

Em 47 pacientes (83,9%) observou-se a presença de condições consideradas predisponentes para colonização/infecção por bactérias multirresistentes. As mais frequentes foram diabetes *mellitus* (n=19 ou 33,9%) e internação prévia nos últimos três meses (n=16 ou 28,6%). Além disso, 49 pacientes (87,5%) utilizaram procedimentos invasivos antes da identificação de CRAB. Dentre esses, 38 (67,9%) utilizaram cateter vascular central e 46 (82,1%) foram submetidos à sondagem vesical de demora e ventilação mecânica. Em 44 pacientes (77,6%) evidenciou-se o uso prévio de antibióticos (antes do isolamento do *Acinetobacter* durante a internação), sendo que os mais utilizados foram os carbapenêmicos, em 19 (33,9%) pacientes, cefalosporinas de 3ª geração, em 18 (32,1%) pacientes (Tabela 3).

Tabela 3 – Condições predisponentes, utilização prévia de procedimentos invasivos e antibióticos em 56 pacientes portadores de CRAB internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010.

Parâmetro	n	%
CONDIÇÃO PREDISPONENTE	47	83,9
Doença oncohematológica	3	5,3
Neoplasia sólida	2	3,6
Imunossupressor	2	3,6
Internação prévia	16	28,6
Internação prévia em UTI	6	10,7
Corticóide	5	8,9
Diabetes <i>mellitus</i>	19	33,9
Insuficiência renal crônica não dialítica	6	10,7
Insuficiência renal crônica dialítica	7	12,5
Insuficiência cardíaca	14	25,0
Doença pulmonar obstrutiva crônica	10	17,8
Insuficiência hepática	6	10,7
PROCEDIMENTO INVASIVO PRÉVIO	49	87,5
Cateter vascular central	38	67,9
Sondagem vesical de demora	46	82,1
Ventilação mecânica	46	82,1
ANTIBIOTICOTERAPIA PRÉVIA	44	78,6
Carbapenêmicos	19	33,9
Cefalosporina de 3ª geração	18	32,1
Cefalosporina de 4ª geração	15	26,8
Fluorquinolona	9	16,0
Inibidores de betalactamase	12	21,4
Vancomicina	15	26,8

A maioria dos pacientes avaliados apresentou disfunção de um ou mais sistemas orgânicos durante a permanência na UTIC, sendo que 46 (82,1%) estiveram em ventilação mecânica e 38 (67,9%) apresentaram instabilidade hemodinâmica com utilização de aminas vasoativas. Em relação à evolução, 33 pacientes (59,9%) evoluíram para o óbito durante a permanência hospitalar (Tabela 4), sendo que 29 (51,8%) durante a internação na Unidade (dados não apresentados).

Tabela 4 – Presença de disfunção clínica e evolução de 56 pacientes portadores de CRAB internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010.

Parâmetro	n	%
DISFUNÇÃO CLÍNICA		
Ventilação mecânica não invasiva	3	5,4
Ventilação mecânica invasiva	46	82,1
Instabilidade hemodinâmica	38	67,9
Uso de amina vasoativa	38	67,9
EVOLUÇÃO		
Melhora/cura/alta	23	41,0
Óbito hospitalar	33	59,0

Na maioria dos pacientes, o isolamento do *Acinetobacter*, que motivou a inclusão neste estudo, representou colonização (67,9%). Conforme demonstrado na Tabela 5, aspirado traqueal representou o principal espécime biológicos associado a infecções por CRAB. Sete (12,5%) cepas foram procedentes de hemoculturas. Ressalta-se que dentre essas 56 amostras, 22 (39,3%) foram coletados nas primeiras 48 horas após a admissão na UTIC. Dentre os 18 pacientes classificados como infectados, nove (50,0%) preencheram os critérios epidemiológicos para IH, segundo os critérios do CDC (NHSN). Nas demais infecções, o diagnóstico de IH foi feito considerando-se apenas a definição feita pelo médico assistente. Em 33,3% dos casos ocorreu concordância entre o diagnóstico clínico e o epidemiológico baseado no CDC. A infecção mais frequente foi a pneumonia, com dez (55,6%) casos, seguida de sepse associada a cateter vascular central, com cinco (27,8%) casos (Tabela 6).

Tabela 5 – Distribuição de frequência de CRAB por material, dos pacientes internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010.

Material	n	%
Aspirado traqueal	11	19,6
Hemocultura	7	12,5
Ponta de cateter	2	3,6
Secreção intrabdominal	1	1,8
Suabe nasal	23	41,1
Suabe perianal	11	19,6
Urina	1	1,8
TOTAL	56	100,0

Tabela 6 – Classificação quanto a infecção hospitalar de 56 pacientes portadores de CRAB internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010.

Parâmetro	n	%
TIPO DE ISOLAMENTO		
Colonização	38	67,9
Infecção hospitalar	18	32,1
CLASSIFICAÇÃO DA INFECÇÃO		
Somente diagnóstico clínico	9	50,0
Somente diagnóstico epidemiológico (NHSN)	3	16,7
Ambos	6	33,3
SÍTIO DE INFECÇÃO		
Órgão cavidade/intrabdominal	1	5,6
Pneumonia	10	55,5
Sepse associada a cateter	5	27,7
Sepse sem foco	1	5,6
Trato urinário	1	5,6

6.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS

As 56 cepas de *A. baumannii* que apresentaram resistência aos carbapenêmicos pelo método de disco difusão foram encaminhadas para o Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas do ICB-USP. Desse total, 13 cepas foram descartadas, pois não puderam ser recultivadas devido à persistente contaminação. Desse modo, 43 (76,8%) das 56 cepas iniciais foram submetidas à avaliação adicional. Não houve diferença nas distribuições de sexo ($p=0,671$), idade ($p=0,067$), óbito na UTIC ($p=0,343$) e óbito hospitalar ($p=0,220$) entre os 43 pacientes portadores das cepas recuperadas quando comparados com os 13 pacientes portadores das cepas restantes.

6.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CEPAS

6.3.1 Perfil de sensibilidade qualitativo pelo método de disco difusão

Conforme demonstra a Tabela 7, os resultados dos antibiogramas, realizados no Setor de Microbiologia da UFPML do HC-UFMG constataram que 24/56 (42,8%) das cepas eram resistentes a todas as drogas testadas. As drogas que mostraram melhor perfil de sensibilidade foram a gentamicina 19 (33,9%) e sulfametoxazol-trimetoprim 12 (21,4%). Todas as cepas foram resistentes aos carbapenêmicos, cefepima, ciprofloxacina, e piperacilina-tazobactam. Apenas duas (3,6%) foram sensíveis a ampicilina-sulbactam. A polimixina B não é testada pelo método de difusão em disco para avaliação de sensibilidade para *A. baumannii*, segundo definição do CLSI/2011.

Tabela 7 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, por meio do método de disco difusão, de 56 cepas de *A. baumannii* isoladas de pacientes internados na UTIC do HC/UFGM, entre dezembro 2009 e dezembro de 2010*.

Antimicrobiano	Sensível		Intermediário		Resistente		Não testado	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Amicacina	4	7,1	2	3,6	50	89,3	-	-
Ampicilina-sulbactam	2	3,6	-	-	50	89,3	4	7,1
Cefepima	0	0,0	0	0,0	56	100,0	0	0,0
Ceftazidima	1	1,8	0	0,0	55	98,2	0	0,0
Ciprofloxacina	0	0,0	0	0,0	55	98,2	1	1,8
Gentamicina	19	33,9	0	0,0	37	66,1	0	0,0
Imipenem	0	0,0	0	0,0	56	100,0	0	0,0
Meropenem	0	0,0	0	0,0	53	94,6	3	5,4
Piperacilina-tazobactam	0	0,0	0	0,0	53	94,6	3	5,4
Sulfametoxazol-trimetoprim	12	21,4	0	0,0	35	62,5	9	16,1

* Testes realizados no Setor de Microbiologia da UFPML do HC/UFGM.

6.3.2 Perfil de sensibilidade quantitativo pela diluição em ágar (CIM)

A Tabela 8 demonstra os resultados da avaliação quantitativa pelo método de diluição em ágar para imipenem, tigeciclina e polimixina B, realizada em 43 cepas. Do total, 25 cepas (58,1%) confirmaram resistência ao imipenem (ponto de corte CLSI 2011, ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$) e uma apresentou sensibilidade intermediária a esse ATM. Dez cepas (23,3%) mostraram-se resistentes à tigeciclina (ponto de corte FDA, > 2 para *Enterobacteriaceae*) e em três (7,0%) evidenciou-se resistência a polimixina B (ponto de corte CLSI 2011, ≥ 4).

Não houve associação entre a resistência ao imipenem ou à polimixina B pelo teste quantitativo e a ocorrência de óbito, seja na UTIC ou durante a internação hospitalar como um todo.

Tabela 8 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, por meio do método de diluição em ágar, de 43 cepas de *A. baumannii* isoladas de pacientes internados na UTIC do HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010*.

Antimicrobiano	Sensível		Intermediário		Resistente	
	n	%	n	%	n	%
Imipenem	17	39,5	1	2,3	25	58,1
Polimixina	40	93,0	0	0,0	3	7,0
Tigeciclina	33	76,7	0	0,0	10	23,3

* Testes realizados no Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas ICB-USP.

6.4 CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA

6.4.1 Teste de dupla difusão com disco (TDDD)

A triagem para a produção de M β L foi realizado mediante avaliação de sinergismo dos antibióticos imipenem e ceftazidima com os inibidores enzimáticos EDTA, MAA e MAP, utilizando o teste de dupla difusão com disco, segundo as recomendações do CLSI ([97] e CLSI, 2006). Todos os resultados foram negativos para este teste sugerindo a ausência de M β L nos isolados estudados.

6.4.2 Pesquisa de Oxacilinas

A detecção dos genes responsáveis pela produção de oxacilinas foi realizada pelo método de PCR. Como esperado, todos os isolados apresentaram positividade para o gene *bla*_{OXA-51}. A positividade para *bla*_{OXA-23} foi detectada em 22 isolados (51,2%), e 8 cepas (18,6%) expressavam *bla*_{OXA-143}.

Dentre as 17 cepas que não confirmaram resistência ao imipenem durante a avaliação quantitativa, 14 (82,4%) não expressavam nenhuma das enzimas adquiridas pesquisadas. Todas essas apresentavam CIM de 0,5 para imipenem. Dentre as três cepas restantes, a cepa classificada como de sensibilidade intermediária ao imipenem (CIM = 8) expressava *bla*_{OXA-23} e as outras duas (CIM = 4) expressavam *bla*_{OXA-23}, sendo que uma delas também expressava *bla*_{OXA-143}. Em duas cepas resistentes ao imipenem não foi identificada nenhuma das oxacilinas adquiridas e nem MβL.

Considerando-se as 43 cepas estudadas, a expressão de *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-143}, ou de ambas simultaneamente, não foi associada à ocorrência de óbito na UTIC ou no hospital.

6.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E ESTUDO DE CLONALIDADE

6.5.1 Análise de polimorfismo (ERIC)

A amplificação dos segmentos conservados presentes no DNA bacteriano foi realizada através do ERIC-PCR, específico para estes segmentos. Os perfis de amplificação gerados na técnica de ERIC-PCR mostraram uma diversidade clonal identificando 15 perfis diferentes nos isolados de *A. baumannii* (Figura 9). Desse modo, na avaliação da similaridade genética feita por análise de *clusters*, utilizando o coeficiente de DICE, foram identificados 15 clones distintos, denominados A-O, com predomínio de seis *clusters* com cepas resistentes ao imipenem (Figura 10) que eram clonalmente relacionadas (B, F, H, J, K e O), utilizando como base uma

similaridade de 90%. Os clones mais frequentes foram os classificados como perfil O (7 cepas) e perfil F (5 cepas). Nota-se que a maioria (4 cepas) do grupo O não expressavam nenhuma das enzimas pesquisadas e as demais (3 cepas) eram produtoras de OXA-23-símile (Quadro 5). No grupo F percebe-se que apenas uma cepa não expressava nenhuma das enzimas pesquisadas, quatro delas expressavam o gene *bla*_{OXA-23} e três também expressavam *bla*_{OXA-143}. Observa-se que cepas sensíveis e resistentes ao imipenem foram agrupadas em um mesmo genótipo por meio do ERIC-PCR, como a cepa 419 e a 417 (perfil A), sensível e resistente ao imipenem, respectivamente, além das cepas 356 e 392 (ambas sensíveis ao imipenem) e as cepas 384, 385 e 399, todas resistentes (perfil F).

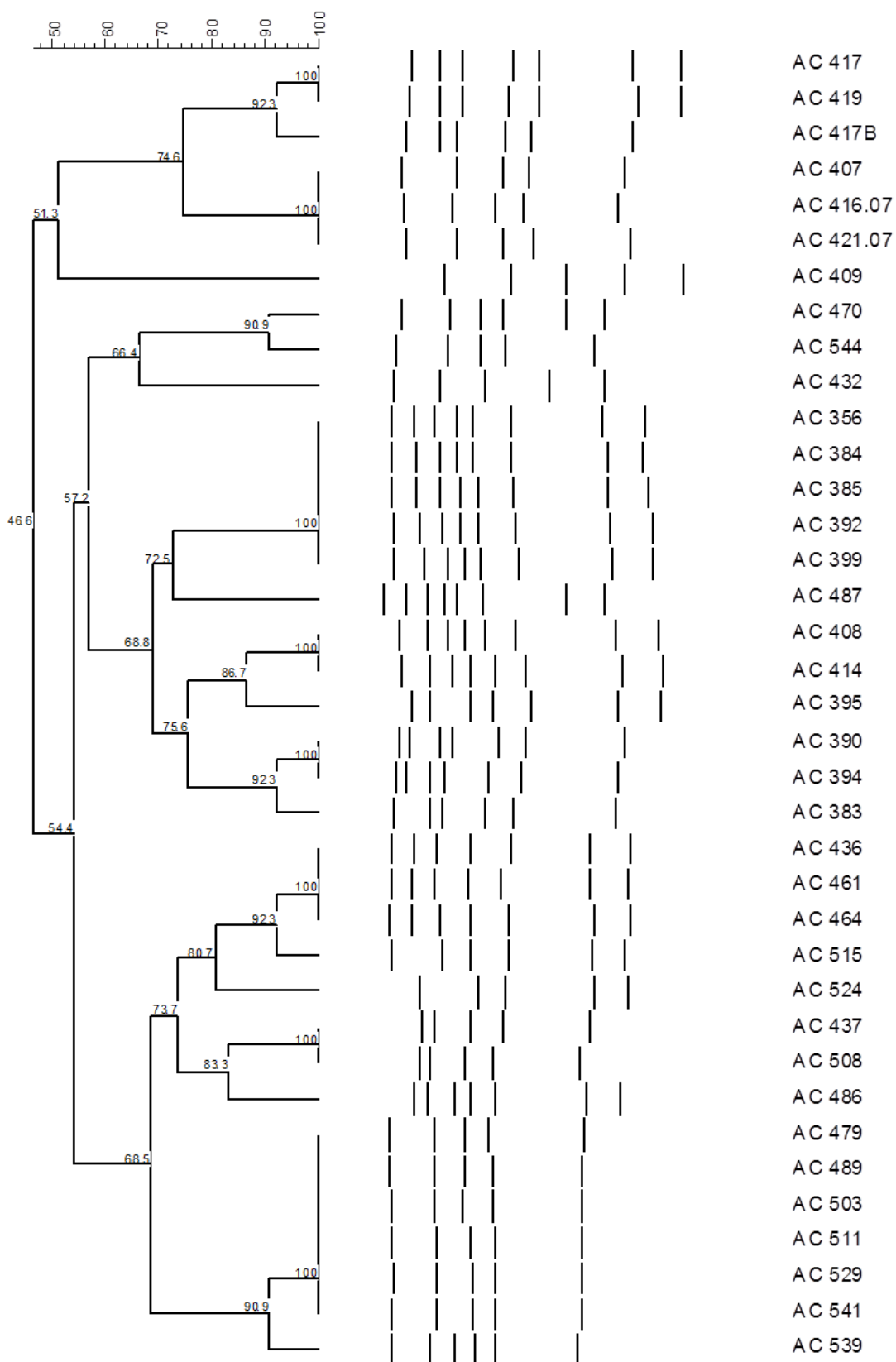


Figura 9 – Dendrograma de 37 cepas *A. baumannii*, isoladas de pacientes internados na UTIC HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010.

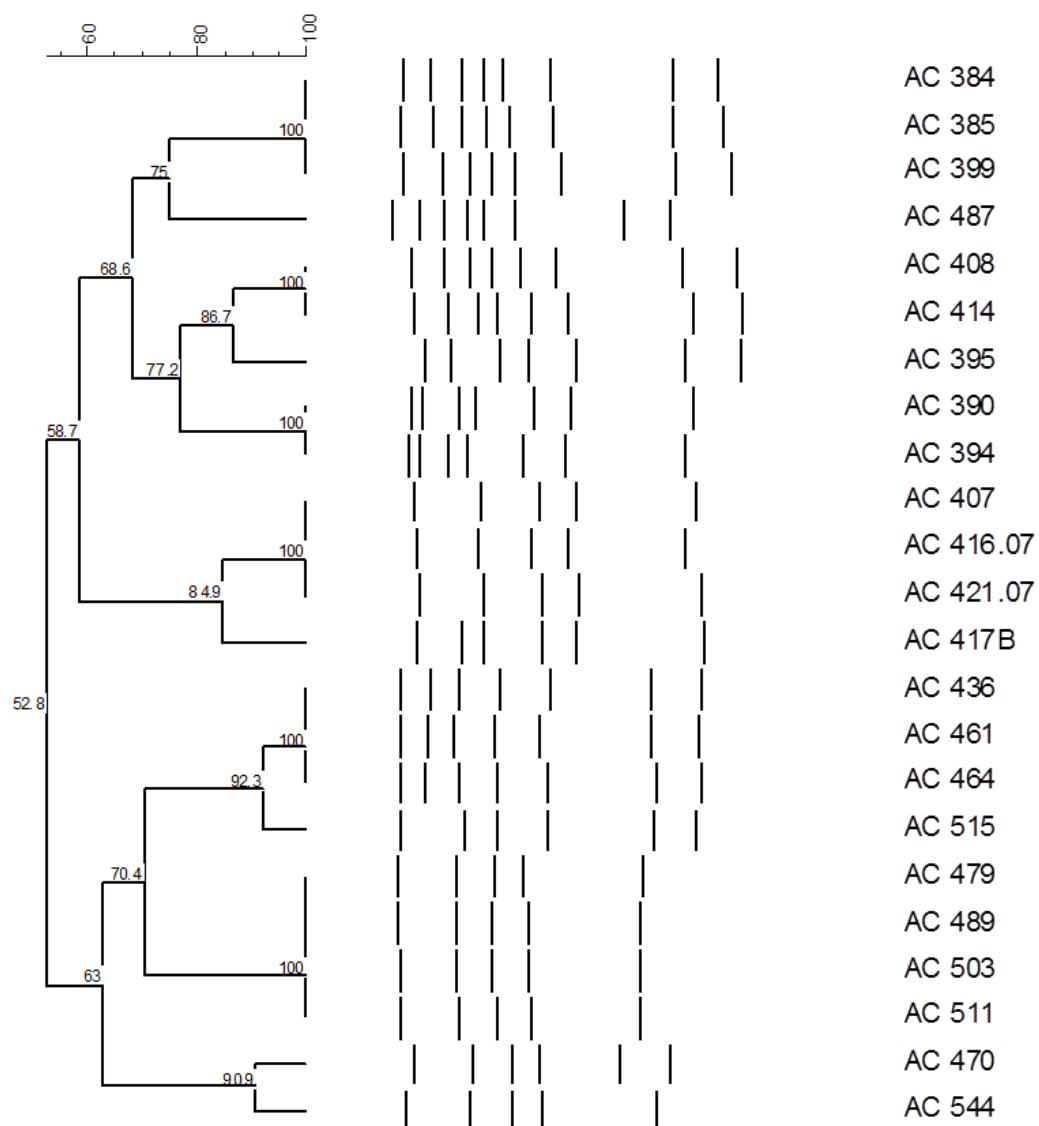


Figura 10 – Dendrograma de 23 cepas de *A. baumannii* resistentes ao imipenem isoladas de pacientes internados na UTIC HC/UFMG, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010.

Quadro 5 – CIM para imipenem, polimixina e tigeciclina, e genes de produção de oxacilinases (sombreado cepas IMP resistentes) identificados em 43 cepas de pacientes internados na UTIC do HC/UFGM, entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010*.

CEPAS	CIM (µg/mL)			<i>bla_{OXA}-like gene</i>			ERIC-2 perfil
	IMP	POL	TIG	<i>bla_{OXA}-51</i>	<i>bla_{OXA}-23</i>	<i>bla_{OXA}-143</i>	
288	>32	1,0	1,0	+	-	+	G2**
295	>32	1,0	2,0	+	-	+	G4**
296	>32	1,0	2,0	+	-	+	H**
297	>32	1,0	1,0	+	-	+	I**
356	4,0	0,5	<0,5	+	+	+	F
363	0,5	1,0	<0,5	+	-	-	Nd**
367	0,5	0,5	<0,5	+	-	-	Nd**
383	0,5	2,0	<0,5	+	-	-	J
384	>32	2,0	2,0	+	+	+	F
385	>32	2,0	4,0	+	+	+	F
390	8,0	4,0	4,0	+	+	-	J1
392	0,5	1,0	<0,5	+	-	-	F
394	16	1,0	4,0	+	+	-	J1
395	16	0,5	2,0	+	+	+	I
399	>32	8,0	4,0	+	+	-	F
407	16	2,0	4,0	+	+	-	B
408	16	1,0	<0,5	+	+	-	H
409	0,5	0,25	<0,5	+	-	-	C
414	>32	1,0	2,0	+	+	-	H
416	16	1,0	4,0	+	+	-	B
417	16	2,0	4,0	+	+	-	A
419	0,5	1,0	<0,5	+	-	-	A
421	16	1,0	4,0	+	+	-	B
432	0,5	0,5	<0,5	+	-	-	E
436	16	0,5	2,0	+	+	-	K
437	0,5	2,0	<0,5	+	-	-	M
461	16	0,5	<0,5	+	+	-	K
464	16	1,0	2,0	+	+	-	K
470	>32	0,5	2,0	+	+	-	D
479	16	4,0	2,0	+	+	-	O
487	16	0,5	4,0	+	+	-	G
489	4,0	1,0	4,0	+	+	-	O
496	0,5	1,0	<0,5	+	-	-	N
503	16	0,5	2,0	+	+	-	O
508	0,5	2,0	<0,5	+	-	-	M
511	16	1,0	2,0	+	-	-	O
515	16	0,5	2,0	+	+	-	K1
524	0,5	1,0	<0,5	+	-	-	L
529	0,5	1,0	<0,5	+	-	-	O
530	0,5	1,0	<0,5	+	-	-	Nd**
539	0,5	1,0	<0,5	+	-	-	O1
541	0,5	2,0	<0,5	+	-	-	O
544	16	1,0	2,0	+	-	-	D1

* Testes realizados no Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas ICB-USP.

** Cepas não apresentadas nos dendogramas.

7 DISCUSSÃO

O *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB) tem emergido nas últimas décadas como um importante micro-organismo causador de infecção nos pacientes hospitalizados, principalmente naqueles imunossuprimidos e internados em unidades de terapia intensiva [18, 100]. Essas cepas caracterizam-se por apresentar resistência intrínseca a múltiplos antimicrobianos e podem adicionalmente adquirir vários mecanismos de resistência. Conseqüentemente, o tratamento das infecções causadas por CRAB representa um enorme desafio clínico-epidemiológico. Adicionalmente, sabe-se que o *A. baumannii* possui uma importante habilidade de sobreviver por longos períodos em superfícies inertes e no ambiente hospitalar, favorecendo a ocorrência de surtos e tornando-se endêmico em diversas instituições [18, 64].

A resistência do CRAB foi descrita em meados da década de 1990 e, desde então, inúmeros estudos têm sido publicados mundialmente [2, 22]. Segundo dados do SENTRY, no período de 2001-2004, a sensibilidade do *A. baumannii* ao imipenem foi de 89% na América do Norte, 74% na Europa e Ásia e de 86% na América Latina [59]. No Brasil, surtos causados por CRAB têm sido descritos desde o início da década de 2000, principalmente nas regiões sul e sudeste [15, 44, 45, 101]. Recentemente, a prevalência crescente de CRAB, em muitas instituições do país (principalmente em unidades de terapia intensiva), tem gerado grande preocupação nos profissionais responsáveis pelo controle de infecções hospitalares, assistência e gestão, fato que aumenta o interesse no entendimento desse processo.

Durante o período deste estudo verificou-se que cerca de 10% dos pacientes admitidos na UTIC apresentaram isolamento de CRAB em diversos espécimes biológicos. Desses pacientes, cerca de 40% foram colonizados anteriormente à admissão na Unidade, já que o isolamento da cepa ocorreu nas primeiras 48 horas após a admissão. A maioria dos pacientes (cerca de 60%) era procedente da sala de emergência do Pronto Atendimento do mesmo hospital onde o estudo foi conduzido e, portanto, a colonização pode ter ocorrido durante a permanência naquele setor. A coleta de dados neste estudo foi realizada de forma retrospectiva, o que limita a definição do momento da colonização desses pacientes.

Em linhas gerais, as características clínico-epidemiológicas dos pacientes se assemelham às encontradas na literatura para colonização/infecção por CRAB. Os pacientes avaliados apresentaram uma longa permanência na terapia intensiva (18,7 dias) e hospitalar (36,7 dias), o que pode ter contribuído para a elevada taxa de colonização/infecção por CRAB. Frequentemente, pacientes com infecções por *A. baumannii* têm permanência hospitalar prolongada [102], mas na vigência de surtos a aquisição do CRAB pode ser precoce.

Segundo a frequência de disfunções orgânicas observadas, os pacientes estudados eram, no geral, muito graves. Por exemplo, 70% apresentaram instabilidade hemodinâmica, e aproximadamente 80% estiveram sob ventilação mecânica. Entretanto, o valor mediano do escore APACHE II foi moderado (i.e., 15; variação de 1 a 32). A UTIC é um setor direcionado ao atendimento de pacientes portadores de patologias cardiovasculares para tratamento clínico, além de pacientes graves, com diferentes condições clínico-cirúrgicas. O valor mediano de APACHE II dos pacientes incluídos neste estudo foi relativamente menor que o encontrado em outros estudos conduzidos em terapia intensiva [65, 101, 103]. Provavelmente, a menor pontuação de APACHE II pode ser explicada por se tratar de uma unidade mista (clínico-cirúrgica e coronariana), onde 10 dos 18 leitos disponíveis são destinados aos portadores de coronariopatias. Estes últimos representaram cerca de 25% dos pacientes estudados e apresentaram um menor escore APACHE II, mediana 12 (variação: 1-21; $p=0,039$, quando comparado com pacientes não coronariopatas). Por fim, os valores de APACHE II mais baixos do que o esperado podem ser em parte explicados pela coleta retrospectiva de dados com potencial erro de informações.

Grande parte dos pacientes (aproximadamente 80,0%) apresentou pelo menos um dos fatores favorecedores para a aquisição de patógenos multirresistentes pesquisados neste estudo. As condições mais frequentes foram o diabetes *mellitus* (33,9%) e a internação prévia nos últimos três meses (28,6%). Sabe-se que o diabetes *mellitus* é uma condição clínica muito prevalente entre os adultos e que contribui para uma maior permanência hospitalar desses pacientes [104]. Nesse estudo, os fatores de risco associados à aquisição e infecção por *A. baumannii* são semelhantes aos identificados para os demais patógenos hospitalares, tais como: elevada permanência hospitalar e em UTI, cirurgia prévia, trauma, utilização de procedimentos invasivos (ventilação mecânica, cateter vascular

central, sondagem vesical de demora), tratamento antimicrobiano prévio com cefalosporinas de terceira geração, fluorquinolona ou carbapenêmicos [1, 64].

Quanto ao uso de procedimentos invasivos prévios (VM, CVC e SVD) associados à colonização/infecção por CRAB, tem-se que cerca de 90% dos pacientes apresentavam pelo menos uma dessas condições. Neste mesmo hospital, Romanelli *et al.* [15] em 2009 evidenciaram que o uso desses procedimentos foi significativamente associado com colonização/infecção por CRAB. Diversos autores têm correlacionado o uso de dispositivos invasivos com colonização por CRAB, reforçando a necessidade de reduzir o tempo de utilização [102, 105].

Setenta e sete por cento dos pacientes utilizaram antibioticoterapia por no mínimo 72 horas antes do primeiro isolamento de CRAB. Os carbapenêmicos, as cefalosporinas (de terceira e quarta geração) e a vancomicina foram os antimicrobianos mais frequentemente utilizados. Muitos estudos tem associado a utilização prévia de antibióticos à colonização/infecção por CRAB, principalmente os carbapenêmicos, drogas muito utilizadas para tratamento de infecções por patógenos MDR, inclusive o *A. baumannii* [15, 101, 105, 106].

A maioria dos pacientes estudados (cerca de 70%) eram colonizados, e não infectados por CRAB. Dentre os 18 episódios de infecção, o principal tipo foi a pneumonia associada à ventilação mecânica (55,6%). Sete pacientes apresentaram hemocultura positiva para CRAB, sendo cinco infecções da corrente sanguínea associadas ao cateter vascular central, uma secundária a infecção do trato urinário e outra sem foco aparente definido. Sabe-se que dentre as infecções hospitalares mais frequentes associadas ao *A. baumannii* estão pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) e a infecção da corrente sanguínea [64]. A distinção entre colonização de vias aéreas e infecção pulmonar representa um grande desafio na prática clínica e pode ser facilitada pela realização de culturas quantitativas seriadas e biomarcadores [107, 108]. Por sua vez, a infecção da corrente sanguínea é o segundo sítio mais descrito de infecção por CRAB [1, 18]. Tem-se que os cateteres vasculares e o trato respiratório são os principais focos causadores de bacteriemias nesses casos [1, 109]. O *A. baumannii* é capaz de aderir a superfícies inertes e biológicas, nas quais é capaz de formar biofilme. Esta característica é um importante mecanismo patogênico, pois facilita a colonização de materiais protéticos, contribuindo assim para resistência aos tratamentos antimicrobianos, além de protegê-lo da ação do sistema imunológico do hospedeiro [62]. Mais

recentemente, a presença desse micro-organismo em hemoculturas tem sido associada à contaminação da amostra, pois não é raro o crescimento polimicrobiano desse micro-organismo, associado a outros colonizadores da pele, como estafilococos coagulase-negativa [1].

Neste estudo, a mortalidade hospitalar foi de cerca de 60%. O impacto clínico das infecções hospitalares causadas por *A. baumannii* tem sido amplamente discutido, visto que muitos estudos descrevem uma elevada mortalidade associada ao patógeno, principalmente naqueles portadores de bacteriemia e pneumonia [109, 110]. Outros trabalhos, entretanto, apresentam o *A. baumannii* como um micro-organismo de baixa virulência. Destaca-se que a presença do *A. baumannii* é mais frequente em pacientes portadores de comorbidades e de pior prognóstico. Por essa razão, supõe-se que a mortalidade observada nos pacientes com infecções por *A. baumannii* seja causada pelas condições clínicas e não seja uma consequência direta da infecção. Blot *et al.* em seu estudo concluíram que a infecção por *Acinetobacter* não estava associada a um aumento na mortalidade atribuída [85]. Em contraste, em uma revisão recente de estudos de coorte e caso-controle, Fallagas *et al.* concluíram que a infecção por *A. baumannii* contribuiu para um aumento na mortalidade atribuída de 7,8% a 23% [84]. Recente surto ocorrido em nossa instituição e apresentado no *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (ICAAC) em 2011, descreve mortalidade associada em cerca de 50% dos pacientes portadores de CRAB com OXA 143. Nesse estudo, sugere-se que a presença do micro-organismo possa ser um marcador de gravidade.

Apesar de inúmeras publicações sugerirem que o *Acinetobacter* é um agente oportunista, esse tema é ainda controverso [54, 111]. A maioria das publicações são descrições de surtos e pouco se estuda sobre o desfecho dos pacientes envolvidos. Estudos de virulência são escassos. Recentemente, Acosta *et al.* descreveram em CRAB dois diferentes genes que codificam enzimas de virulência: a septicolisina e uma proteína produzida pelo gene receptor TonB-dependente. Na verdade, esse estudo analisou um surto prolongado com duração de 30 meses e 65 casos de bacteriemia em 94 pacientes, onde dois diferentes clones de CRAB OXA-24 determinaram mortalidade de cerca de 50% dos pacientes [63].

A triagem de cepas CRAB foi realizada no Setor de Microbiologia da UFPML do HC/UFMG por meio de método de disco difusão. Esse método foi desenvolvido por Bauer *et al.* [47] em 1966 para a avaliação de sensibilidade bacteriana aos

antimicrobianos, utilizando-se discos impregnados por antibióticos. Desde então, é um dos métodos mais empregados por ser de fácil execução, não requerer equipamentos especiais e ser relativamente barato. Entretanto, o método de Bauer apresenta algumas limitações, já que pequenas variações no procedimento ou no material utilizado podem levar a resultados falso-positivos. Nosso trabalho mostrou que dentre as 43 cepas classificadas como resistentes ao imipenem pelo teste qualitativo de disco difusão, apenas 25, cerca de 60% delas confirmaram resistência pelo método quantitativo de diluição em ágar. Uma possível causa para essa discrepância entre os dois métodos seria a utilização de discos de antimicrobianos de qualidade duvidosa (sem a quantidade adequada de ATM) como encontrado no estudo brasileiro de Sejas *et al.* que constatou que, em uma das marcas avaliadas, houve concordância de apenas 58,6%. Ressalta-se que nenhuma das marcas avaliadas, dentre aquelas distribuídas no Brasil, apresentou desempenho satisfatório [112]. Outra possibilidade é relacionada ao armazenamento inadequado dos discos de ATM, já que em determinadas condições há perda do ATM e, portanto, possibilidade de resultados falso-positivos.

Segundo o método de disco difusão, cerca de 50% das cepas estudadas apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados. Dentre os antimicrobianos, aqueles de pior desempenho foram os carbapenêmicos e o ciprofloxacino (100% de resistência em ambos) e a ampicilina-sulbactam (96,4% de resistência). Dados semelhantes foram descritos por Ferreira *et al.* em 2011, que encontraram cerca de 100% de resistência a essas drogas [113]. Em nosso estudo, o melhor perfil de susceptibilidade foi à gentamicina (33,9%) e ao sulfametoxazol-trimetoprim (21,4%). A gentamicina, em estudos anteriores, era considerada uma importante opção terapêutica para infecções por *Acinetobacter*. Entretanto, com a aquisição de resistência a múltiplos ATM, a utilização dos aminoglicosídeos tornou-se limitada contra esse patógeno. Os aminoglicosídeos agem contra o *Acinetobacter* por meio de inibição de sua síntese protéica [9, 22]. A resistência a essa classe ocorre através de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, como acetiltransferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases, ou através de bomba de efluxo [9]. Os aminoglicosídeos, geralmente, são considerados como inadequados como monoterapia para tratamento de infecções graves, principalmente em PAV, devido a sua pobre penetração pulmonar, mas permanecem como uma boa opção terapêutica em ITU. Maragakis *et al.* ponderam

que os aminoglicosídeos são opções terapêuticas adequadas para o manejo de infecções por CRAB sensíveis a esses ATM. Apesar disso, os aminoglicosídeos são mais frequentemente utilizados em terapia combinada para infecções graves [22] e em monoterapia para infecções leves, a exemplo do trato urinário [21].

Em nosso estudo, as cepas CRAB apresentaram sensibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprim em cerca de 25% dos casos. Apesar de ser um ATM recomendado pelo CLSI para ser testado no antibiograma de *Acinetobacter* spp., não existem relatos na literatura sobre o uso de sulfametoxazol-trimetoprim em infecções causadas por esse micro-organismo. Trata-se de uma droga bacteriostática, com boa difusão tecidual, o que gera concentrações séricas adequadas nas doses usualmente recomendadas. Essa droga é frequentemente recomendada para o tratamento de infecções causadas por outros bastonetes Gram negativos não-fermentadores, a exemplo da *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia*.

As outras opções terapêuticas, após a exclusão dos carbapenêmicos são a tigeciclina, a ampicilina-sulbactam e as polimixinas. Em nosso estudo, a sensibilidade das cepas a tigeciclina foi de 76,7%, inferior ao encontrado no trabalho de Rossi *et al.* Nesse estudo (TEST), que avaliou amostras de vários hospitais da América Latina, observou-se uma sensibilidade do CRAB a tigeciclina de 97,1%. [114]. Apesar dos bons níveis de sensibilidade do *A. baumannii* à tigeciclina e diversos relatos de casos de tratamento de infecções por esse micro-organismo, devemos levar em consideração a topografia da infecção. Até o presente momento, o ATM não foi liberado pelo FDA para o tratamento de infecções pulmonares [92], provavelmente devido a não publicação de estudos randomizados em que a tigeciclina não tenha demonstrado inferioridade quando comparada ao tratamento padrão para infecções pulmonares. Infelizmente, esse é o sítio mais frequentemente acometido por CRAB. Outro fator que deve ser considerado é a falta de definição de pontos de corte nos testes de sensibilidade. Há relato de discrepância entre a técnica de disco difusão (falsa resistência), quando comparada às CIMs encontradas pelo *E-test*[®] e, desses, com a microdiluição [21]. Finalmente, vários questionamentos têm sido feitos em relação à dose ideal para o tratamento com tigeciclina, especialmente em infecções por micro-organismos de CIM elevadas (1-2 µg/mL). Estudos têm demonstrado que, particularmente nas infecções urinárias e na sepse, a concentração da tigeciclina pode ser subótima, havendo casos de

bacteriemias por *A. baumannii* em pacientes recebendo esse antimicrobiano [21].

Uma opção para o tratamento de CRAB é o sulbactam, comercializado no Brasil em associação com a ampicilina. Diversos estudos têm evidenciado eficácia no tratamento de infecções causadas por cepas de *Acinetobacter* MDR, quando esses se mostram sensíveis a essa droga [94, 115, 116]. No Brasil, Levin *et al.* (2003) evidenciaram resposta favorável (67,5%) ao tratar infecções por *A. baumannii* MDR [94]. Entretanto, no nosso estudo, a ampicilina-sulbactam não foi uma alternativa para o tratamento de infecções por CRAB, pois apenas duas cepas (3,6%) apresentaram sensibilidade a essa droga.

No presente trabalho, evidenciamos resistência à polimixina B em três (7%) das 43 cepas estudadas (CIM \geq 4 μ g/mL, CLSI 2011). Essa ocorrência é muito preocupante, pois a polimixina é na atualidade a principal opção terapêutica para o tratamento de infecções por CRAB. Gales *et al.* em 2005 relataram dados do SENTRY, no qual 2.621 cepas de *A. baumannii* foram avaliadas, oriundas de todos os continentes. Nesse estudo, verificou-se que apenas 2,1% das cepas estudadas eram resistentes a polimixina. Cepas de *A. baumannii* resistentes a polimixina foram detectadas em 33 centros médicos, localizados em 18 países. Na América Latina, dez dos 11 isolados resistentes a polimixina foram identificados em um único hospital brasileiro. Em 2011, Gales *et al.*, no estudo INVITA-A-DORI, avaliaram o perfil de sensibilidade de 805 bastonetes de coloração negativa ao Gram, coletados em hospitais privados brasileiros. Nesse caso, o *Acinetobacter* spp. foi o quarto agente mais comum (13,9%) e a frequência de resistência desse micro-organismo a polimixina foi de apenas 1,8% [117].

Vale ressaltar que o teste de susceptibilidade a polimixina apresenta limitações. A droga parece não difundir bem no ágar sólido, havendo dificuldades para interpretação do teste de disco difusão. Os pontos de corte ainda não estão absolutamente definidos. O CLSI (2011) recomenda considerar, para *Acinetobacter* spp., valor \leq 2 μ g/mL como sensível e \geq 4 μ g/mL como resistente. Neste estudo optou-se por utilizar os valores recomendados pelo CLSI (2011). Os níveis de eficácia terapêutica da polimixina para o tratamento de CRAB variam de 50% a maior que 80%, e se assemelham às respostas de outras drogas em populações semelhantes [88]. Recentemente, Oliveira *et al.* publicaram um estudo que evidenciou eficácia clínica e toxicidade semelhantes entre as duas polimixinas no tratamento de infecções graves por CRAB [89]. Embora as polimixinas representem

a melhor opção terapêutica para o tratamento de CRAB, ainda existe uma grande carência de estudos que retratem a real segurança de se utilizar doses elevadas, muitas vezes necessárias no tratamento das infecções graves.

Em relação aos mecanismos de resistência, nosso estudo não evidenciou a produção de metalo- β -lactamases pelas cepas avaliadas, concordando com os trabalhos brasileiros de Schimith Bier *et al.* e Dalla-Costa *et al.* [45, 118]. As M β L, também conhecidas com β -lactamases da classe B de Ambler, são capazes de hidrolisar todos os β -Lactâmicos, exceto o aztreonam [119]. Essas enzimas são produzidas intrinsecamente por algumas bactérias, entretanto desde a década de 1990, novos genes que codificam M β L têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, como o *Acinetobacter* spp. Atualmente, são conhecidas cinco variantes de M β L adquiridas: IMP, VIM, SPM, GIM e SIM-1. Gales *et al.* em 2003 descreveram o primeiro *Acinetobacter* produtor de M β L, uma variante IMP-1 [120]. Posteriormente, Tognim *et al.* verificaram a presença de IMP-1 em 54,8% das amostras de *Acinetobacter* spp. provenientes desse mesmo hospital em São Paulo [121]. Recentemente, Ferreira *et al.* encontraram 28% das cepas de *Acinetobacter* spp. com teste fenotípico positivo para M β L, entretanto nenhum dos isolados carregavam os genes *bla*-VIM e *bla*-SPM. Esse resultado provavelmente reflete a baixa especificidade do método utilizado (técnica de aproximação de discos) para a detecção de M β L em *Acinetobacter* spp. [113].

No presente trabalho, por meio da técnica de PCR, identificaram-se os genes produtores de oxacilinases: *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-143} nas 43 cepas estudadas. As oxacilinases são também conhecidas com β -lactamases da classe D de Ambler e são as carbapenemases mais encontradas no *Acinetobacter* spp. As oxacilinases, carbapenemases do *Acinetobacter*, são divididas nos subgrupos OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 (enzimas adquiridas) e a OXA-51 que é intrínseca ao *A. baumannii*. Todos os isolados do nosso estudo confirmaram a presença do gene *bla*_{OXA-51}. A natureza ubíqua desse gene em *A. baumannii* o torna um importante marcador genético na identificação dessa espécie [122]. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de esclarecer o real papel da enzima OXA-51-símile, responsável pela resistência intrínseca do *A. baumannii*. Acredita-se que a OXA-51 possa controlar a susceptibilidade aos carbapenêmicos e, apesar de ser uma carbapenemase de fraca atividade, pode algumas vezes ser hiperproduzida e resultar no aumento da CIM [123].

A produção de carbapenemase do tipo OXA-23 tem sido um importante mecanismo de resistência, frequentemente identificado em isolados de *A. baumannii* recuperados de hospitais brasileiros. De fato, a OXA-23 tem sido responsável pelo fenótipo de multirresistência em amostras de *A. baumannii* isoladas em diversos hospitais de São Paulo, Rio de Janeiro, Curitiba e Porto Alegre [45, 124, 125], inclusive produzindo surtos fatais de infecção em Curitiba [44]. Neste trabalho, essa enzima também foi a carbapenemase adquirida predominante, presente em 22 (51,2%) dos isolados estudados. Esse gene foi descrito pela primeira vez em *A. baumannii* em 1995 [126]. Essa enzima, originalmente denominada ARI-1, foi identificada na Escócia e era codificada por plasmídeo [127]. Posteriormente, a enzima foi renomeada OXA-23 segundo sua caracterização genética e bioquímica. Está associada a elementos de inserção IS*Aba1* e IS*Aba4*. O gene *bla*_{OXA-23} foi identificado em cepas de diversos países como França, Reino Unido, Coreia, Romênia, Polinésia Francesa e Brasil [44, 72, 128, 129].

No nosso estudo, o gene *bla*_{OXA-143} foi encontrado em oito cepas (18,6%). O gene *bla*_{OXA-143} é até o momento o único representante de um novo subgrupo, restrito ao Brasil, e inicialmente descrito por Higgins *et al.* (2009). Esse gene codifica uma carbapenemase mediada por plasmídeo e é relacionada com enzimas do grupo OXA-40 (88% de identificação) e ainda não foi associado a nenhum elemento de sequência de inserção ou com integrons [42]. Antônio *et al.*, publicaram um estudo de isolados de CRAB procedentes de hospitais de São Paulo, que apresentaram uma alta prevalência de OXA-143 (58,3%) [43]. Mais recentemente, foi identificado um surto ocorrido no HC-UFMG, causado por cepas de CRAB produtoras de OXA-143 (ICAAC, 2011).

Correlacionando-se a susceptibilidade ao imipenem com a presença de oxacilinases, observou-se que quase todos os isolados resistentes ou com sensibilidade intermediária ao imipenem apresentaram pelo menos uma oxacilinase adquirida, OXA-23 ou OXA-143. Entretanto, em duas cepas resistentes ao imipenem (419 e 432) não foi identificado nenhum mecanismo enzimático, o que nos leva a acreditar que outros mecanismos, como alterações na permeabilidade da membrana bacteriana (perda de canais de porina ou super-expressão de bomba de efluxo) possam estar presentes. Ressalta-se que algumas cepas classificadas como sensíveis, pelo teste quantitativo, eram produtoras de oxacilinases e apresentavam CIM elevadas (CIM = 4,0 µg/mL).

Para avaliação da diversidade clonal foi utilizada a técnica molecular de ERIC-PCR, escolhida por apresentar boa capacidade discriminatória, reprodutibilidade, facilidade de interpretação, rapidez e baixo custo [130]. O poder discriminatório da técnica é comparável ao do PFGE na tipagem de *A. baumannii* [83]. Neste estudo, utilizou-se para definição de relação epidemiológica molecular uma similaridade de 90%. Desse modo, evidenciou-se uma ampla diversidade genética entre as cepas, sugerindo disseminação policlonal de CRAB. Foram identificados 15 clones distintos, com predomínio de seis *clusters* contendo cepas imipenem resistentes clonalmente relacionadas. A maioria dos estudos apresenta disseminação policlonal desse micro-organismo [45, 118, 125, 131], usualmente em surtos. Em alguns estudos tem-se a disseminação clonal, inclusive em surtos interinstitucionais [45, 113, 132]. Cepas sensíveis e resistentes ao imipenem foram agrupadas dentro de um mesmo genótipo ERIC, a exemplo das cepas 419 e 417 (perfil A), sensível e resistente ao imipenem, respectivamente. Outro exemplo são as cepas 356 e 392, sensíveis e as cepas 384, 385 e 399, resistentes (perfil F). Essa situação pode refletir a dinamicidade na aquisição de um elemento móvel, como plasmídeo, que carrega genes de resistência do tipo *bla*_{OXA-23} e/ou *bla*_{OXA-143}. Esses elementos podem ser facilmente adquiridos por cepas endêmicas previamente sensíveis. Isso confirma a importância de elementos móveis no fenômeno de aquisição de resistência aos antimicrobianos. Dessa forma, podemos concluir que surtos de CRAB podem ser causados por cepas sem uma origem clonal comum, entretanto, esses patógenos carregam um mesmo determinante genético de resistência.

8 CONCLUSÕES

- Os pacientes colonizados ou infectados por CRAB, internados na UTIC, apresentaram elevada prevalência de comorbidades e fatores de risco associados à colonização/infecção por bactérias MDR, como o uso de procedimentos invasivos e antibioticoterapia prévia. Esses pacientes apresentaram longa duração de permanência na UTIC e no hospital, assim como elevada mortalidade hospitalar.
- As cepas de CRAB isoladas na UTIC do HC/UFMG apresentaram limitada sensibilidade à maioria dos antimicrobianos pela metodologia de disco difusão. As drogas que apresentaram maior sensibilidade foram a gentamicina e o sulfametoxazol-trimetoprim.
- O método de disco difusão, pelo menos no nosso meio, gerou resultados falso-positivos (falsa resistência aos carbapenêmicos) em considerável parcela das amostras (quase 40%), o que indica a necessidade de controle da qualidade mais rigoroso para a realização do antibiograma por esse método.
- A resistência à polimixina B mostrou-se superior àquela relatada na literatura, situação que aumenta o risco de pacientes apresentarem infecções por CRAB sem opções de terapia antimicrobiana.
- O principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos do *A. baumannii* em nosso meio foi a produção de oxacilinasas, notadamente OXA-23.
- A produção de M β L não representou mecanismo frequente de resistência expressa por CRAB em nosso meio. Outros mecanismos de resistência podem estar presentes, pois duas das cepas de CRAB estudadas não expressavam nenhum gene relacionado à produção de carbapenemases.
- As cepas CRAB, isoladas de pacientes internados na UTIC, apresentaram ampla diversidade genética definindo-se um padrão de disseminação policlonal.

9 LIMITAÇÕES

- Trata-se de um estudo unicêntrico, com número pequeno de pacientes, o que limita a generalização dos resultados. A inclusão de um grupo controle, obtido na mesma unidade (UTIC) permitiria uma melhor avaliação dos fatores de risco para colonização ou infecção pelo *A. baumannii* no HC/UFMG, assim como da mortalidade associada ou atribuída a esse micro-organismo. Dificuldades logísticas e a exiguidade de prazo para realização do estudo impediram a inclusão de mais pacientes.
- A coleta retrospectiva de dados pode ter se associado a erros nos cálculos de APACHE II e na caracterização clínica dos pacientes estudados.
- Treze das 56 amostras (23,2%) inicialmente incluídas no estudo foram perdidas. Como exposto acima, essas amostras foram repicadas em meio ágar sangue, em três ocasiões distintas, havendo contaminação com outras espécies, fato que inviabilizou a avaliação microbiológica. Após a ocorrência desse problema, houve reformulação do protocolo de congelamento de amostras biológicas praticado pela CCIH-HC.
- Para a seleção de cepas resistentes utilizou-se o método de disco difusão e todas as amostras estudadas apresentaram concordância de resistência ao imipenem e meropenem. Entretanto a determinação da CIM foi realizada apenas para o imipenem.
- Foram avaliados apenas os mecanismos de resistência relacionados a fenômenos enzimáticos. Alterações de permeabilidade da membrana aos carbapenêmicos, como alterações de canais de porina ou super expressão de bomba de efluxo não foram investigados nesse estudo.

10 PROPOSTAS

- Realizar um estudo caso-controle a fim de estabelecer os fatores de risco associados à colonização e definir preditores de risco para infecção por CRAB em nosso meio, e avaliar a mortalidade atribuída ao CRAB.
- Avaliar possibilidade de abordagem terapêutica diversificada ou em combinação, quando permitido pelo estudo de sensibilidade, para tratamento de infecções por CRAB.
- Rever os protocolos de definição de resistência aos carbapenêmicos utilizados na UFPML do HC-UFMG.
- Realizar rotineiramente testes quantitativos (E-test[®]) para avaliar a sensibilidade à polimixina B dos CRAB isolados de espécimes clínicos de relevância.
- Manter vigilância epidemiológica e microbiológica contínua para avaliar a introdução de novos clones com comportamento de virulência distinto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Munoz-Price LS, Weinstein RA. Acinetobacter infection. The New England journal of medicine. 2008 Mar 20;358(12):1271-81.
- [2] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007 Oct;51(10):3471-84.
- [3] Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R. Multiresistant Acinetobacter baumannii infections: epidemiology and management. Current opinion in infectious diseases. 2010 Aug;23(4):332-9.
- [4] Orsi GB, Franchi C, Giordano A, Rocco M, Ferraro F, Mancini C, et al. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii outbreak in an intensive care unit. Journal of chemotherapy (Florence, Italy). 2008 Apr;20(2):219-24.
- [5] Wybo I, Blommaert L, De Beer T, Soetens O, De Regt J, Lacor P, et al. Outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in a Belgian university hospital after transfer of patients from Greece. The Journal of hospital infection. 2007 Dec;67(4):374-80.
- [6] Moro M, Nizzero P, Biancardi A, Baldan R, Scarpellini P, Curti C, et al. An outbreak caused by multidrug-resistant OXA-58-positive Acinetobacter baumannii in an intensive care unit in Italy. The Journal of hospital infection. 2008 Jan;68(1):97-9.
- [7] Gales AC, Pfaller MA, Sader HS, Hollis RJ, Jones RN. Genotypic characterization of carbapenem-nonsusceptible Acinetobacter spp. isolated in Latin America. Microbial drug resistance (Larchmont, NY. 2004 Winter;10(4):286-91.
- [8] Tognim MC, Andrade SS, Silbert S, Gales AC, Jones RN, Sader HS. Resistance trends of Acinetobacter spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Int J Infect Dis. 2004 Sep;8(5):284-91.
- [9] Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa. Clin Infect Dis. 2006 Sep 1;43 Suppl 2:S49-56.
- [10] Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2006 Sep;12(9):826-36.
- [11] Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2007 Dec;60(6):1206-15.
- [12] Michalopoulos A, Falagas ME. Colistin and polymyxin B in critical care. Critical care clinics. 2008 Apr;24(2):377-91, x.
- [13] Manual de Orientação para Controle da Disseminação de Acinetobacter sp Resistente a Carbapenêmicos no Município de Porto Alegre. In: Alegre. SMdSdP, ed. Porto Alegre 2007:43.
- [14] von Dolinger de Brito D, Oliveira EJ, Abdallah VO, da Costa Darini AL, Filho PP. An outbreak of Acinetobacter baumannii septicemia in a neonatal intensive care unit of a university hospital in Brazil. Braz J Infect Dis. 2005 Aug;9(4):301-9.
- [15] Romanelli RM, Jesus LA, Clemente WT, Lima SS, Rezende EM, Coutinho RL, et al. Outbreak of resistant Acinetobacter baumannii- measures and proposal for prevention and control. Braz J Infect Dis. 2009 Oct;13(5):341-7.
- [16] Dijkshoorn L, Nemec A. The diversity of the genus *Acinetobacter*: Norfolk: Caister Academic Press 2008.

- [17] Towner KJ. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. *The Journal of hospital infection*. 2009 Dec;73(4):355-63.
- [18] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008 Jul;21(3):538-82.
- [19] Murray. *Manual of clinical microbiology*. 8 ed. Washington, DC 2003.
- [20] Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. *Journal of medical microbiology*. 2006 Dec;55(Pt 12):1619-29.
- [21] Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, Gales AC. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert review of anti-infective therapy*. 2010 Jan;8(1):71-93.
- [22] Maragakis LL, Perl TM. Acinetobacter baumannii: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*. 2008 Apr 15;46(8):1254-63.
- [23] Vila J, Marti S, Sanchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007 Jun;59(6):1210-5.
- [24] Barros JCS. Análise da amplificação a resistência à gentamicina por cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes a antimicrobianos isoladas de fezes de recém-nascidos em ambiente hospitalar. [monografia]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 1993.
- [25] Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of Acinetobacter baumannii in a French hospital. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Aug;41(8):3542-7.
- [26] Schmitt R. Molecular biology of transposable elements. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1986 Oct;18 Suppl C:25-34.
- [27] Collis CM, Hall RM. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *Journal of bacteriology*. 1992 Mar;174(5):1574-85.
- [28] Kholodii GY, Yurieva OV, Lomovskaya OL, Gorlenko Z, Mindlin SZ, Nikiforov VG. Tn5053, a mercury resistance transposon with integron's ends. *Journal of molecular biology*. 1993 Apr 20;230(4):1103-7.
- [29] Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*. 1980 May 16;289(1036):321-31.
- [30] Bush K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis*. 1998 Aug;27 Suppl 1:S48-53.
- [31] Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003 Feb;47(2):582-7.
- [32] Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International journal of antimicrobial agents*. 2010 Nov;36 Suppl 3:S8-14.
- [33] Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of Serratia marcescens that shows imipenem resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1994 Jan;38(1):71-8.
- [34] Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999 Jul;43(7):1584-90.

- [35] Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2002 Nov;50(5):673-9.
- [36] Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004 Dec;48(12):4654-61.
- [37] Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005 Nov;49(11):4485-91.
- [38] Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert opinion on investigational drugs*. 2008 Feb;17(2):131-43.
- [39] Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009 Dec;53(12):5046-54.
- [40] Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008 Nov;52(11):4194-7.
- [41] Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010 Jun;54(6):2420-4.
- [42] Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009 Dec;53(12):5035-8.
- [43] Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, Elmor de Araujo MR, Lincopan N. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the blaOXA-143 gene in Brazilian hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011 Mar;55(3):1322-3.
- [44] Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Jul;41(7):3403-6.
- [45] Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *International journal of antimicrobial agents*. 2009 Jul;34(1):25-8.
- [46] Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003 Mar;51(3):565-74.
- [47] Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*. 1966 Apr;45(4):493-6.
- [48] Rossi F. Resistência Bacteriana - Interpretando o antibiograma 2005.

- [49] Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001 Feb;7(2):88-91.
- [50] Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *Journal of clinical microbiology*. 2002 Dec;40(12):4741-3.
- [51] Canduela MJ, Gallego L, Sevillano E, Valderrey C, Calvo F, Perez J. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from elderly patients with respiratory tract infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006 Jun;57(6):1220-2.
- [52] Dolin MB. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed 2005.
- [53] Rodriguez-Bano J, Cisneros JM, Fernandez-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, et al. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004 Oct;25(10):819-24.
- [54] Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis*. 2006 Mar 1;42(5):692-9.
- [55] Sader HS, Jones RN, Andrade-Baiocchi S, Biedenbach DJ. Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2002 Nov;44(3):273-80.
- [56] Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J. 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*. 2001 May 15;32 Suppl 2:S104-13.
- [57] Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis*. 2001 Aug;5(4):200-14.
- [58] Mendes C, Hsiung A, Kiffer C, Oplustil C, Sinto S, Mimica I, et al. Evaluation of the in vitro activity of 9 antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis*. 2000 Oct;4(5):236-44.
- [59] Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect*. 2006 Apr;12(4):315-21.
- [60] Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vanechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of clinical microbiology*. 1997 Nov;35(11):2819-25.
- [61] Dijkshoorn L, van Aken E, Shunburne L, van der Reijden TJ, Bernards AT, Nemec A, et al. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Apr;11(4):329-32.
- [62] Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents*. 2010 Mar;35(3):219-26.

- [63] Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerging infectious diseases*. 2011 Jun;17(6):1064-7.
- [64] Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature reviews*. 2007 Dec;5(12):939-51.
- [65] Playford EG, Craig JC, Iredell JR. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. *The Journal of hospital infection*. 2007 Mar;65(3):204-11.
- [66] McDonald LC, Banerjee SN, Jarvis WR. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987-1996. *Nosocomial Infections Surveillance System. Clin Infect Dis*. 1999 Nov;29(5):1133-7.
- [67] Jawad A, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Exceptional desiccation tolerance of *Acinetobacter radioresistens*. *The Journal of hospital infection*. 1998 Jul;39(3):235-40.
- [68] Catalano M, Quelle LS, JERIC PE, Di Martino A, Maimone SM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases. *The Journal of hospital infection*. 1999 May;42(1):27-35.
- [69] Wendt C, Dietze B, Dietz E, Ruden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of clinical microbiology*. 1997 Jun;35(6):1394-7.
- [70] Houang ET, Sormunen RT, Lai L, Chan CY, Leong AS. Effect of desiccation on the ultrastructural appearances of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter lwoffii*. *Journal of clinical pathology*. 1998 Oct;51(10):786-8.
- [71] Cetin ES, Durmaz R, Tetik T, Otlu B, Kaya S, Caliskan A. Epidemiologic characterization of nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. *American journal of infection control*. 2009 Feb;37(1):56-64.
- [72] Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. *Journal of clinical microbiology*. 2005 May;43(5):2241-5.
- [73] Naas T, Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K, Bajolet O, Bernet C, et al. VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerging infectious diseases*. 2006 Aug;12(8):1214-22.
- [74] Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, Vangala K, Ravishankar J, et al. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. *Archives of internal medicine*. 2002 Jul 8;162(13):1515-20.
- [75] Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003 Apr;24(4):284-95.
- [76] Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical microbiology reviews*. 2006 Jul;19(3):512-30.
- [77] Speijer H, Savelkoul PH, Bonten MJ, Stobberingh EE, Tjhe JH. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *Journal of clinical microbiology*. 1999 Nov;37(11):3654-61.
- [78] Thong KL, Lai KS, Ganeswrie R, Puthuchery SD. Pulsed-field gel electrophoresis of multidrug-resistant and -sensitive strains of *Pseudomonas aeruginosa* from a Malaysian hospital. *Japanese journal of infectious diseases*. 2004 Oct;57(5):206-9.

- [79] Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt TL. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical microbiology*. 1995 Mar;33(3):528-34.
- [80] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 1995 Sep;33(9):2233-9.
- [81] Rementeria A, Gallego L, Quindos G, Garaizar J. Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. *Clin Microbiol Infect*. 2001 Jun;7(6):331-6.
- [82] Seifert H, Gerner-Smidt P. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *Journal of clinical microbiology*. 1995 May;33(5):1402-7.
- [83] Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004 Oct;25(10):847-51.
- [84] Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos, II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Critical care (London, England)*. 2006;10(2):R48.
- [85] Blot S, Vandewoude K, Colardyn F. Nosocomial bacteremia involving *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: a matched cohort study. *Intensive care medicine*. 2003 Mar;29(3):471-5.
- [86] Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J. Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: a matched cohort study. *Critical care medicine*. 2003 Oct;31(10):2478-82.
- [87] Kwon KT, Oh WS, Song JH, Chang HH, Jung SI, Kim SW, et al. Impact of imipenem resistance on mortality in patients with *Acinetobacter* bacteraemia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007 Mar;59(3):525-30.
- [88] Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis*. 2010 Jul 1;51(1):79-84.
- [89] Oliveira MS, Prado GV, Costa SF, Grinbaum RS, Levin AS. Polymyxin B and colistimethate are comparable as to efficacy and renal toxicity. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009 Dec;65(4):431-4.
- [90] Kallel H, Bahloul M, Hergafi L, Akrouf M, Ketata W, Chelly H, et al. Colistin as a salvage therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant bacteria in the ICU. *International journal of antimicrobial agents*. 2006 Oct;28(4):366-9.
- [91] Levin AS, Barone AA, Penco J, Santos MV, Marinho IS, Arruda EA, et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*. 1999 May;28(5):1008-11.
- [92] Peterson LR. A review of tigecycline--the first glycycline. *International journal of antimicrobial agents*. 2008 Dec;32 Suppl 4:S215-22.
- [93] Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008 Jul;62(1):45-55.
- [94] Levin AS, Levy CE, Manrique AE, Medeiros EA, Costa SF. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with

- ampicillin/sulbactam. *International journal of antimicrobial agents*. 2003 Jan;21(1):58-62.
- [95] Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *The Lancet infectious diseases*. 2008 Dec;8(12):751-62.
- [96] LR D. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*. 1945;26:379-93.
- [97] Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *Journal of clinical microbiology*. 2000 Jan;38(1):40-3.
- [98] Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *Journal of clinical microbiology*. 2002 Aug;40(8):2755-9.
- [99] Aydin F, Gumussoy KS, Atabay HI, Ica T, Abay S. Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *Journal of applied microbiology*. 2007 Jul;103(1):27-35.
- [100] Falagas ME, Karveli EA, Siempos, II, Vardakas KZ. *Acinetobacter* infections: a growing threat for critically ill patients. *Epidemiology and infection*. 2008 Aug;136(8):1009-19.
- [101] Prates CG, Martins AF, Superti SV, Lopes FS, Ramos F, Cantarelli VV, et al. Risk factors for 30-day mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in an intensive care unit. *Epidemiology and infection*. 2010 Mar;139(3):411-8.
- [102] Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernandez-Hinojosa E, Aldabo-Pallas T, Cayuela A, Marquez-Vacaro JA, et al. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive care medicine*. 2005 May;31(5):649-55.
- [103] Jung JY, Park MS, Kim SE, Park BH, Son JY, Kim EY, et al. Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. *BMC infectious diseases*. 2010 10:228.
- [104] Krinsley JS. Association between hyperglycemia and increased hospital mortality in a heterogeneous population of critically ill patients. *Mayo Clinic proceedings*. 2003 Dec;78(12):1471-8.
- [105] Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *The Journal of hospital infection*. 2006 Sep;64(1):7-15.
- [106] Marra AR, de Almeida SM, Correa L, Silva M, Jr., Martino MD, Silva CV, et al. The effect of limiting antimicrobial therapy duration on antimicrobial resistance in the critical care setting. *American journal of infection control*. 2009 Apr;37(3):204-9.
- [107] Lisboa T, Seligman R, Diaz E, Rodriguez A, Teixeira PJ, Rello J. C-reactive protein correlates with bacterial load and appropriate antibiotic therapy in suspected ventilator-associated pneumonia. *Critical care medicine*. 2008 Jan;36(1):166-71.
- [108] Ramirez P, Garcia MA, Ferrer M, Aznar J, Valencia M, Sahuquillo JM, et al. Sequential measurements of procalcitonin levels in diagnosing ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J*. 2008 Feb;31(2):356-62.
- [109] Seifert H, Strate A, Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine*. 1995 Nov;74(6):340-9.

- [110] Cisneros JM, Reyes MJ, Pachon J, Becerril B, Caballero FJ, Garcia-Garmendia JL, et al. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. *Clin Infect Dis*. 1996 Jun;22(6):1026-32.
- [111] Harbarth S, Nobre V, Pittet D. Does antibiotic selection impact patient outcome? *Clin Infect Dis*. 2007 Jan 1;44(1):87-93.
- [112] Sejas LL. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. *Revista Brasileira de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2003;39(1):27-35.
- [113] Ferreira AE, Marchetti DP, da Cunha GR, de Oliveira LM, Fuentefria DB, Dall Bello AG, et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. from hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011 Nov-Dec;44(6):725-30.
- [114] Rossi F, Garcia P, Ronzon B, Curcio D, Dowzicky MJ. Rates of antimicrobial resistance in Latin America (2004-2007) and in vitro activity of the glycolcycline tigecycline and of other antibiotics. *Braz J Infect Dis*. 2008 Oct;12(5):405-15.
- [115] Wood GC, Hanes SD, Croce MA, Fabian TC, Boucher BA. Comparison of ampicillin-sulbactam and imipenem-cilastatin for the treatment of acinetobacter ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2002 Jun 1;34(11):1425-30.
- [116] Betrosian AP, Frantzeskaki F, Xanthaki A, Georgiadis G. High-dose ampicillin-sulbactam as an alternative treatment of late-onset VAP from multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2007;39(1):38-43.
- [117] Gales AC, Azevedo HD, Cereda RF, Girardello R, Xavier DE. Antimicrobial activity of doripenem against Gram-negative pathogens: results from INVITA-A-DORI Brazilian study. *Braz J Infect Dis*. 2011 Dec;15(6):513-20.
- [118] Schimith Bier KE, Luiz SO, Scheffer MC, Gales AC, Paganini MC, Nascimento AJ, et al. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. *American journal of infection control*. 2010 May;38(4):308-14.
- [119] Mendes RE. Metallo-B-lactamases. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(2):10.
- [120] Gales AC, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2003 Jan;45(1):77-9.
- [121] Tognim MC, Gales AC, Penteado AP, Silbert S, Sader HS. Dissemination of IMP-1 metallo- beta -lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006 Jul;27(7):742-7.
- [122] Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Aug;44(8):2974-6.
- [123] Brown S, Young HK, Amyes SG. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Jan;11(1):15-23.
- [124] Mostachio AK, van der Heidjen I, Rossi F, Levin AS, Costa SF. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Journal of medical microbiology*. 2009 Nov;58(Pt 11):1522-4.
- [125] Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection*. 2009 Oct;37(5):474-6.

- [126] Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1995 Sep;36(3):585-6.
- [127] Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000 Jan;44(1):196-9.
- [128] Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R, et al. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Jul;43(7):3074-82.
- [129] Naas T, Levy M, Hirschauer C, Marchandin H, Nordmann P. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Sep;43(9):4826-9.
- [130] Syrmis MW, O'Carroll MR, Sloots TP, Coulter C, Wainwright CE, Bell SC, et al. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *Journal of medical microbiology*. 2004 Nov;53(Pt 11):1089-96.
- [131] Qi C, Malczynski M, Parker M, Scheetz MH. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. *Journal of clinical microbiology*. 2008 Mar;46(3):1106-9.
- [132] Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, et al. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Oct;44(10):3623-7.

APÊNDICE A – Formulário de coleta de dados



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
SERVIÇO DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR
***Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenems**

**IDENTIFICAÇÃO**Cepa Registro Nome Sexo: M F I

Data de Nascimento ___ / ___ / ____

Data de entrada no HC (inclui PA) ___ / ___ / ____

Data de saída do HC ___ / ___ / ____

INTERNAÇÃO NA UNIDADE CORONARIANA

Data de entrada na UCO ___ / ___ / ____

Tipo de internação: Clínica Cirurgia eletiva Cirurgia de urgência / emergência

Categoria diagnóstica:	Cardiovascular <input type="checkbox"/>	Endócrino	Endócrinológico <input type="checkbox"/>	Monitoração <input type="checkbox"/>
	Choque (exceto sepse) <input type="checkbox"/>	Hemato-Onco	Hemato-Onco <input type="checkbox"/>	Neurológico <input type="checkbox"/>
	Clínica - Outras <input type="checkbox"/>	Hepático	Hepático <input type="checkbox"/>	Gineco-Obstétrico <input type="checkbox"/>
	Cuidados paliativos <input type="checkbox"/>	Infecção/Sepse	Infecção/Sepse <input type="checkbox"/>	Pós-PCR <input type="checkbox"/>
	TGI <input type="checkbox"/>	Insuf. respiratória	Insuf. respiratória <input type="checkbox"/>	Renal <input type="checkbox"/>

FATORES DE RISCO

Comorbidades/Fator risco	Dç oncohematológica <input type="checkbox"/>	Corticóide	Corticóide <input type="checkbox"/>	Insuf. cardíaca (III-IV) <input type="checkbox"/>
	Neoplasia sólida <input type="checkbox"/>	Diabetes melitus	Diabetes melitus <input type="checkbox"/>	DPOC <input type="checkbox"/>
Intern.prévia (3m) <input type="checkbox"/>	Imunossupressor <input type="checkbox"/>	IRC não dialítica	IRC não dialítica <input type="checkbox"/>	Insuf. hepática (Child B-C) <input type="checkbox"/>
Intern. prévia CTI (3m) <input type="checkbox"/>	Uso prévio ATM (3m) <input type="checkbox"/>	IRC dialítica	IRC dialítica <input type="checkbox"/>	

Dispositivo invasivo antes do isolamento:	CVC <input type="checkbox"/>	Tempo de uso:	até 7 dias <input type="checkbox"/>	8-30 dias <input type="checkbox"/>	>30 dias <input type="checkbox"/>
	SVD <input type="checkbox"/>		até 7 dias <input type="checkbox"/>	8-30 dias <input type="checkbox"/>	>30 dias <input type="checkbox"/>
	VM <input type="checkbox"/>		até 7 dias <input type="checkbox"/>	8-30 dias <input type="checkbox"/>	>30 dias <input type="checkbox"/>

Uso de antimicrobianos antes do isolamento:	Cefalosporina 3ª geração <input type="checkbox"/>	Fluorquinolona <input type="checkbox"/>
	Cefalosporina 4ª geração <input type="checkbox"/>	Carbapenems <input type="checkbox"/>
	Vancomicina <input type="checkbox"/>	Inib de betalactamase <input type="checkbox"/>

APACHE II

Temperatura: ___ °C	Se FiO2 > 0,5 (A-a)O2: ___ **	Creatinina: ___ (mg/dl)	Insuf. órgãos: não <input type="checkbox"/>
FR: ___ ipm	Se FiO2 < 0,5: PaO2: ___	Ht: ___ (%)	não cirúrgico <input type="checkbox"/>
FC: ___ ipm	Sem GA: HCO3-: ___ (mmol/L)	WBC: ___ (x10 ³ /mm ³)	cirúrgico eletivo <input type="checkbox"/>
PA média: ___ mmHg	pH arterial: ___	Glasgow: ___	cirurgico urgência <input type="checkbox"/>
FR: ___ ipm	Sódio: ___ (mmol/L)	Idade: ___ anos	
	Potássio: ___ (mmol/L)		

** Para cálculo do Gradiente (A-a)O2: PaCO2: ___ PaO2: ___ FiO2: ___

EVOLUÇÃO NA UNIDADE CORONARIANA

Isolamento: colonização <input type="checkbox"/>	Sítio da IH: Sepses sem foco <input type="checkbox"/>	Bacteriemia
infecção <input type="checkbox"/>	Cateter <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ign <input type="checkbox"/>
Classificação da IH: diag. clínico <input type="checkbox"/>	PNM <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ign <input type="checkbox"/>
NHSN <input type="checkbox"/>	ITU <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ign <input type="checkbox"/>
	Intrabdominal <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ign <input type="checkbox"/>
	Pele/partes moles <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ign <input type="checkbox"/>
	ISC <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ign <input type="checkbox"/>
	Outras <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ign <input type="checkbox"/>

Condições clínicas na UCO: VM não invasiva <input type="checkbox"/>	Instabilidade hemodinâmica <input type="checkbox"/>
VM invasiva <input type="checkbox"/>	Uso amina vasoativa <input type="checkbox"/>

Evolução: Melhora/cura/alta <input type="checkbox"/>	Óbito <input type="checkbox"/>
Data: ___/___/___	Transferência <input type="checkbox"/>

MICROBIOLOGIA

Data do 1o isolamento do Acinetobacter: ___ / ___ / ___			
CULTURAS - CEPA ENVIADA			
Data	Cód. Mat.	Material	
PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS			
DISCO DIFUSÃO			
aztreonam		SMT-TMP	Legenda: R: resistente S: sensível I: intermediário NT: não testado
amicacina		ciprofloxacina	
gentamicina		imipenem	
ceftazidime		meropenem	
cefepime		tigeciclina (não tem halo)	
ampicilina/sulbactam		polimixina (não tem halo)	
TESTE QUANTITATIVO (E-test ou diluição)			
imipenem		Legenda: Imipenem e Meropenem: S ≤4 - I: 8 - R ≥16 Polimixina: S ≤2 - R ≥4	
tigeciclina			
polimixina			
PESQUISA DE BETA-LACTAMASE			
Resultado		Legenda: P: positivo N: negativo NR: não realizada	

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 0215.0.203.000-10

**Interessado(a): Profa. Wanessa Trindade Clemente
Departamento Propedêutica Complementar
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 22 de setembro de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Perfil fenotípico e genotípico das cepas de Acinetobacter spp. resistentes aos carbapenems isoladas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Teresa Marques Amaral", is written over a faint, illegible stamp.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**