Laís Calissi Brisolla Tavares

**Caracterização genética e perfil de sensibilidade
antimicrobiana de cepas multirresistentes de
Acinetobacter baumannii presentes em um hospital de
ensino**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Dr. Carlos Henrique Camargo

**São Paulo
2017**

Laís Calissi Brisolla Tavares

**Caracterização genética e perfil de sensibilidade
antimicrobiana de cepas multirresistentes de
Acinetobacter baumannii presentes em um hospital de
ensino**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Dr. Carlos Henrique Camargo

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tavares, Laís Calissi Brisolla

Caracterização genética e perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* presentes em um hospital de ensino / Laís Calissi Brisolla Tavares. -- São Paulo, 2017.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Carlos Henrique Camargo.

Descritores: 1.*Acinetobacter baumannii* 2.Infecção hospitalar 3.Anti-Infecciosos 4.Reação em cadeia de polimerase 5.Testes de sensibilidade microbiana 6.beta-Lactamases 7.Infecções bacterianas

USP/FM/DBD-505/17

DEDICATÓRIA

Aos meus avós Ioni Miller Calissi e Mário Aparecido Calissi, que são meu refúgio, minha fonte de energia e personificações do amor em meio às atribulações.

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao plano espiritual, acima de tudo e por tudo.

Aos meus avós Ioni e Mário, por todo o suporte, carinho e pela compreensão durante todos esses anos. Sem vocês por perto eu não teria chegado até aqui!

Aos meus pais Rosa Maria e Paulo, por sempre terem me provido do necessário e de ainda muito mais a fim de que eu conquistasse todos os objetivos da minha vida e realizasse cada sonho meu. Pelo amor, apoio e carinho incondicionais. Por terem acreditado, assim como eu, que eu poderia chegar até aqui. Não há nada na minha vida que não seja graças a vocês.

À minha irmã Ísis por todo o amor, toda a amizade e cumplicidade. Você é a certeza e o conforto de que jamais estarei só nessa grande viagem.

A toda a minha família, por ser tão presente e prestativa. Cada telefonema, cada visita, conversa e convite alegram meus dias.

Às minhas amigas Ana Paula Cassiolato, Juliana Failde, Juliana Pinhata, Natália Fernandes, Nathamy Fernanda e, especialmente, Gabriela Francisco e Maria Fernanda Bueno por todo auxílio profissional, pessoal e pela nossa amizade que transcende a pós-graduação.

Aos amigos Viviane Santana, Cristiane Pinho, Muriel Cestari e Eugênio Telles por todo o apoio e compreensão sempre.

Às amigas Fracotes Ana Maria Ruocco, Fernanda Helena Palermo, Juliana Stahl Pinto, Marília Quinalha e Suyen Safuan Naide, irmãs que a vida me deu. É maravilhoso poder acompanhar a evolução e os desdobramentos do caminho de cada uma. Vocês são parte de quem eu sou hoje.

Aos amigos Gabriela Fonseca, Letícia Oliveira e Marcelo Corral por terem me recebido tão calorosamente no programa de pós-graduação, dando-me a oportunidade de participar ativamente do programa e, principalmente, por toda a ajuda e amizade.

Aos companheiros Sérgio Bokermann, Vanda Eliana Garcia Brandolim, Izilda Penha Rodrigues Zuba, Djalma Zuba e todo o Grupo de Amigos, por terem me devolvido tantas vezes ao eixo e me ensinado a ter calma e paciência – ou, ao menos, tentado.

Ao meu orientador Carlos Henrique Camargo, pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos transmitidos e pela grande inspiração. Por ter acreditado no meu potencial e me dado espaço para crescer, me desenvolver e me descobrir.

Aos colegas Francielli Mahnic, William Vaz de Souza e Daniel Sant'ana, pelo auxílio no laboratório e pela troca de experiências.

Aos membros da banca de qualificação Dr^a Sílvia Figueiredo Costa, Dr. Rodrigo Cayô da Silva e Dr^a Erica Chimara pelas valiosas sugestões, as quais contribuíram imensamente para este trabalho.

À pesquisadora Dr^a Monique Ribeiro Tiba Casas, pela parceria na realização dos experimentos laboratoriais.

À Roseli Santos, secretária do programa de pós-graduação da Divisão de Doenças Infecciosas e Parasitárias, por ter sido sempre muito solícita, por todo o auxílio e esclarecimento sempre que necessário.

Aos colaboradores da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, UNESP, campus de Botucatu: Me. Adriano Martison Ferreira, Dr. Alessandro Lia Mondelli, Dr. Augusto Cezar Montelli, Me. Taisa Trevizani Rocchetti, Dr^a Terue Sadatsune, pela parceria neste trabalho.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) pela concessão da amostragem e de dados epidemiológicos utilizados nesse estudo.

À Divisão de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da USP.

Ao núcleo de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz e todos os seus funcionários.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (processo 2015/13179-4).

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2015/13179-4 (bolsa de mestrado).

“Acima de tudo, não tema os momentos difíceis. O melhor vem deles.”

Rita Levi-Montalcini

***“Se assumirmos que chegamos [à verdade absoluta], nós paramos de procurar,
nós paramos de desenvolver.”***

Jocelyn Bell Burnell

RESUMO

Tavares LCB. Caracterização genética e perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* presentes em um hospital de ensino [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

As espécies do Complexo *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* (ACB) são importantes causadoras de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde em todo o mundo. Detêm maior relevância os isolados com resistência aos antimicrobianos, os quais impactam negativamente no prognóstico, na mortalidade e custos associados ao cuidado com o paciente. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de 134 isolados multirresistentes de *A. baumannii* presentes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, entre 2007 e 2014. A identificação de *A. baumannii* deu-se pela pesquisa dos genes *bla*_{OXA-51-like} e *gltA*, detectados em 85% (n=114) dos isolados. Os isolados de *Acinetobacter* não-*baumannii* foram identificados por sequenciamento gênico como *A. nosocomialis* (n=4; 3,1%), *A. pittii*, *A. bereziniae* (n=2; 1,7%, cada), *A. ursingii*, *A. variabilis*, *A. gyllenbergii* (n=1; 0,9% cada) e *Acinetobacter* spp (n=2; 1,7%). Os isolados de *A. baumannii* foram submetidos às técnicas de PCR multiplex para detecção de outras oxacilinases, pesquisa de *ISAb*₁, teste de susceptibilidade antimicrobiana, tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE), por sequência trilocus (3LST) e por sequência multilocus (MLST). Detectou-se o gene *bla*_{OXA-23-like} em 105 isolados (92,1%), estando 100% associados a *ISAb*₁; *bla*_{OXA-72} em um isolado (0,9%) e *bla*_{OXA-231} em dois isolados (1,7%). A maior parte (n=66; 57,9%) dos isolados foi classificada como extensivamente resistentes (XDR). O PFGE agrupou os isolados em 11 clusters (A-K) e o MLST identificou os isolados pertencentes majoritariamente aos clones CC79 (42,4%), CC1 (16,6%), CC15 (12,1%) e ao ST317 (18,2%). Os resultados do MLST e 3LST concordaram em 95,6%. Foi verificada a ocorrência de diferentes perfis de PFGE em *A. baumannii* MDR e XDR, predominando cepas carreadoras de *ISAb*₁/OXA-23-like e pertencentes aos CC1, CC15, CC79, ST317. Predominaram o ST317 nos anos iniciais e o CC79 (ST730) de 2011 a 2014. Estes resultados fornecem subsídios que ressaltam a necessidade de monitoramento e controle de patógenos multirresistentes.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; infecção hospitalar; antimicrobianos; epidemiologia molecular; oxacilinases; 3LST; clonalidade.

ABSTRACT

Tavares LCB. Genetic characterization and antimicrobial susceptibility profile of multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains present at a teaching hospital [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Species of *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* Complex (ACB) are important causes of Healthcare Associated Infections worldwide. More relevant are isolates with antimicrobial resistance, which have a negative impact on the outcome, mortality and costs associated with patient care. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity and the antimicrobial susceptibility profile of 134 multiresistant ACB species strains present at Botucatu Medical School Teaching Hospital between 2007 and 2014. Identification of *A. baumannii* species was by detection of *bla*_{OXA-51-like} and *gltA* genes, detected in 85% (n=114) of the isolates. Non-*baumannii* *Acinetobacter* species were identified by gene sequencing as *A. nosocomialis* (n=4, 3.1%), *A. ursingii*, *A. variabilis*, *A. gyllenbergii* (n=1, 0.9% each) and *Acinetobacter* spp (n=2; 1.7%). *A. baumannii* isolates were submitted to multiplex PCR for other oxacillinases and *ISAba1* detection, antimicrobial susceptibility testing, molecular typing by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), trilocus sequence typing (3LST) and multilocus sequence typing (MLST). *bla*_{OXA-23-like} gene was detected in 105 isolates (92.1%), of which 100% were associated with *ISAba1*; *bla*_{OXA-72} was present in one isolate (0.9%) and *bla*_{OXA-231}, in two isolates (1.7%). The majority (n=66; 57.9%) of isolates were classified as extensively resistant (XDR). The PFGE grouped the isolates into 11 clusters (A-K) and MLST identified the isolates belonging mainly to CC79 (42.4%), CC1 (16.6%), CC15 (12.1%) and ST317 (18.2%). MLST and 3LST results were 95.6% concordant. We verified the occurrence of different PFGE profiles in multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *A. baumannii*, predominantly presenting *ISAba1*/*OXA-23-like* genes and belonging to CC1, CC15, CC79 and ST317. There was a prevalence of ST317 in the early years and CC79 (ST730) from 2011 to 2014. Our results highlight the importance of surveillance and control of multiresistant pathogens.

Key-words: *Acinetobacter baumannii*; cross infection; anti-infective agents; molecular epidemiology; oxacillinases; 3LST; clonality

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3LST	Trilocus Sequence Typing
ACB	<i>Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii</i>
AK	Amicacina
AmpC	Beta-lactamase da classe C de Ambler
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>bla</i>	Gene codificador de Beta-lactamase
CAZ	Ceftazidima
CC	Complexo Clonal
CCIRAS	Comissão de Controle de Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention
CHDL	Carbapenem-hydrolising class D β -lactamases (β -lactamases hidrolíticas de carbapenem da classe D de Ambler)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMED	Centro de Informática Médica
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMHCA	Caldo Miller-Hinton Cátion Ajustado
<i>cpn60</i>	Gene codificador de Chaperonina 60-KDa
<i>csuE</i>	Gene associado a formação de biofilme
CTX	Cefotaxima
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica

ddNTP	Dideoxynucleotídeo
DLV	Doble Loci Variante
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRS	Departamento Regional de Saúde
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamase (beta-lactamase de amplo espectro)
FEP	Cefepime
<i>fusA</i>	Gene de proteína de elongação
<i>gltA</i>	Gene citrato sintetase
GN	Gentamicina
HC-FMB	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu
IC	International Clone (Clone Internacional)
IMP	Imipenem
IPM	Imipenemase
IP	Instituto Pasteur
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde
ITS	Espaçador intergênico das subunidades 16S-23S do RNA
kb	Quilobase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LEV	Levofloxacin
Mb	Megabase
MBL	Metallo-beta-lactamase

MDR	Multidrug Resistant (multirresistente)
MEM	Meropenem
MIN	Minociclina
MLST	Multilocus Sequence Typing
MR	Multi-resistente
NC	Não-classificado
NDM	New Delhi Metalo-betalactamase
NI	Não-informado
<i>ompA</i>	Gene codificador da porina de membrana externa A
OXA	Oxacilinase
PB	Polimixina B
PBP	Penicilin Binding Protein (protein ligadora de penicilina)
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação da polimerase em cadeia)
PEP	Prontuário Eletrônico do Paciente
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (eletroforese em campo pulsado)
PS	Pronto-socorro
PTZ	Piperacilina-tazobactam
<i>recA</i>	Gene codificador do fator de elongação homólogo
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
<i>rpIB</i>	Gene codificador de proteína L2 da porção ribossomal 50S
<i>rpoB</i>	Gene da sub-unidade beta do RNA polimerase B
S	Sensível

SAM	Ampicilina-sulbactam
SIM	Seoul Imipenemase
SLV	Single Locus Variante
ST	Sequence Type
SUS	Sistema Único de Saúde
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TBE	Tris Borato EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tetraciclina
TE	Tris-EDTA
TG	Tigeciclina
TIM	Ticarciclina-ácido clavulânico
TOB	Tobramicina
TSA	<i>Tryptic soy agar</i>
UO	Universidade de Oxford
UPGMA	Unweighted pair group method with mathematical averaging
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VAP	Ventilation Associated Pneumonia (pneumonia associada à ventilação mecânica)
VIM	Verona Imipenemase
XDR	Extremely Drug Resistant (extensivamente resistente)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Epidemiologia global de *Acinetobacter* resistente a carbapenêmicos
Fonte: Kim et al. 201429
- Figura 2.** Distribuição dos grupos de enzimas oxacilinases pelos diferentes estados brasileiros. Baseado em Medeiros e Lincopan (2013) com atualizações (Carvalho et al., 2015; de Sá Cavalcanti et al., 2016; de Sá Cavalcanti et al., 2013; Girlich et al., 2014; Martins e Barth, 2013; Pagano et al., 2017)37
- Figura 3.** Estrutura dos cinco transposons carreadores do gene *bla*_{OXA-23}, em *Acinetobacter baumannii*.39
- Figura 4.** Frequência de *Acinetobacter* spp. isolados de hemoculturas no período entre 2007 e 2014 no HC-FMB. As colunas indicam a % de culturas com crescimento de *Acinetobacter* (escala à esquerda) enquanto a linha indica o número de culturas positivas, por ano (escala à direita).77
- Figura 5 .** Dendrograma elaborado com um isolado representante de cada pulsotipo definido a partir da análise do teste de PFGE. Relação entre pulsotipos, número de amostras de cada pulsotipo, STs e CCs definidos pela técnica de MLST88
- Figura 6.** Dendrograma resultante da análise do teste de PFGE dos isolados de *A. nosocomialis*, combinado aos dados de CIM para imipenem e merepenem, perfil de susceptibilidade, ano de isolamento e grupo de enfermarias referentes aos isolados.89
- Figura 7.** Dendrograma resultante da análise do teste de PFGE dos isolados de *A. pittii*, combinado aos dados de CIM para imipenem e merepenem, perfil de susceptibilidade, ano de isolamento e grupo de enfermarias referentes aos isolados.89
- Figura 8.** Distribuição dos Complexos Clonais definidos pela técnica de MLST segundo o protocolo do Instituto Pasteur no período do estudo.97

LISTA DE QUADROS

Quadro I- Espécies descritas de <i>Acinetobacter</i> até 2017 e suas respectivas publicações válidas.....	24
Quadro II- Classificação comparativa das β -lactamases de acordo com Bush, Jacoby e Medeiros (2010) e Ambler (1980). Em destaque, as OXA-enzimas..	32
Quadro III- Correspondência entre as classificações de clonalidade em Clone Internacional, Grupo Clonal e Complexo Clonal.....	47
Quadro IV- <i>Primers</i> , tamanho do produto esperado e condições de amplificação para a região ITS, 16S rRNA e dos genes <i>rpoB</i> e <i>gltA</i> do Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i>	55
Quadro V- <i>Primers</i> , tamanho do produto esperado e condições de amplificação para detecção dos genes <i>bla_{OXA}</i> e <i>ISAb_{a1}</i> em espécies do Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i>	59
Quadro VI- <i>Primers</i> , tamanho do produto esperado e condições de amplificação para amplificação dos genes codificadores de OXA-51-like, OXA-143-like e OXA-24/40-like pré-sequenciamento em espécies do Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i>	62
Quadro VII- <i>Primers</i> , tamanho do produto esperado e condições de amplificação para amplificação dos genes codificadores das carbapenemases SPM, IPM, VIM, NDM, KPC, OXA-48.....	63
Quadro VIII- <i>Primers</i> , tamanho do produto esperado e condições de amplificação para determinação do grupo clonal de <i>Acinetobacter baumannii</i> por meio de duas reações de multiplex-PCR.....	69
Quadro IX- Interpretação dos resultados das reações de multiplex-PCR para determinação do grupo clonal de <i>Acinetobacter baumannii</i> (Karah et al., 2012).	70
Quadro X- <i>Primers</i> , tamanho do produto esperado e condições de amplificação para PCR multiplex método 3LTS para <i>A. baumannii</i> (Martins et al., 2016)	72
Quadro XI- Interpretação dos resultados das reações de multiplex-PCR para determinação do grupo clonal de <i>Acinetobacter baumannii</i> (Martins et al., 2016).....	72
Quadro XII- Iniciadores, tamanho do produto esperado e condições de amplificação MLST segundo protocolo do Instituto Pasteur.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Informações epidemiológicas referentes aos 134 isolados selecionados para o estudo	79
Tabela 2- Frequência e metodologia da identificação das diferentes espécies de <i>Acinetobacter</i> (n=127)	80
Tabela 3- Resultados das principais provas fenotípicas para identificação de <i>Acinetobacter não-baumannii</i>	81
Tabela 4- Distribuição e associações dos genes das oxacilinases encontrados entre os isolados (n=114)	82
Tabela 5- Associação do elemento de inserção IS <i>Aba1</i> a jusante e a montante dos genes <i>bla</i> _{OXA-51-like} em isolados do Complexo ACB isoladas de pacientes com bacteremias atendidos pelo HC-FMB entre 2007 e 2014 (n=114)	83
Tabela 6- Associação do elemento de inserção IS <i>Aba1</i> à jusante e à montante dos genes <i>bla</i> _{OXA-23-like} em isolados do Complexo ACB isoladas de pacientes com bacteremias atendidos pelo HC-FMB entre 2007 e 2014 (n=105)	83
Tabela 7- Classificação quanto a susceptibilidade dos 114 isolados de <i>A. baumannii</i> para os fármacos amicacina, cefepime, ceftazidima, cefotaxime, ciprofloxacina, gentamicina, levofloxacina, piperacilina-tazobactam, sulfametoxazol-trimetoprim, ticarcilina-ácido clavulânico e tobramicina	85
Tabela 8- Isolados susceptíveis a imipenem e meropenem carreadoras exclusivamente de OXA-51-like e sua relação com o elemento de inserção IS <i>Aba1</i> , classificação quanto ao perfil de resistência e valores da CIM para imipenem e meropenem	86
Tabela 9- Cálculo de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ para os fármacos imipenem, meropenem, tetraciclina, ampicilina-sulbactam, minociclina, tigeciclina e polimixina B e classificação quanto a susceptibilidade dos isolados	87
Tabela 10- Distribuição dos isolados e das oxacilinases entre os Grupos Clonais segundo Karah et al., 2012	91
Tabela 11- Distribuição dos isolados e das oxacilinases entre os Grupos Clonais segundo Martins et al., 2016	92
Tabela 12- Características dos isolados não classificados pela técnica de m3LST (Martins et al., 2016) e seus respectivos STs (Instituto Pasteur)	93
Tabela 13- Relação dos STs identificados no estudo pela técnica de MLST (Instituto Pasteur), dos Complexos Clonais e a distribuição dos isolados entre eles	94
Tabela 14- Correlação entre os resultados de agrupamento da amostragem em Complexos Clonais pela técnica de m3LST (Martins et al., 2016) e MLST	95

Tabela 15- Correlação entre os resultados de agrupamento da amostragem em Complexos Clonais pela técnica de 3LST (Turton et al., 2006) e MLST.....	95
Tabela 16- Correlação entre os clusters definidos por PFGE e Complexos Clonais determinados por MLST e sua distribuição entre os agrupamentos de enfermarias do HC-FMB	96
Tabela 17- Correspondência entre os alelos sequenciados de OXA-51-like, os STs e os Complexos Clonais definidos pela técnica de MLST	98
Tabela 18- Detecção das oxacilinases e do elemento de inserção IS <i>Aba1</i> por PCR; no cálculo de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ para os antimicrobianos imipenem, meropenem, tetraciclina, ampicilina-sulbactam, minociclina e polimixina B; para a definição de clusters através da técnica de PFGE, do agrupamento das amostras pelos métodos de 3LST de Karah e colaboradores (2012) e Martins e colaboradores (2016); definição de STs e Complexos Clonais por MLST em <i>A. baumannii</i> (n=102)	99

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde	22
1.2	<i>Acinetobacter</i> spp.	23
1.3	Resistência antimicrobiana em <i>Acinetobacter</i>	28
1.4	Mecanismos de resistência a carbapenêmicos	30
1.5	Oxacilinases CHDL	33
1.5.1	OXA-51-like	33
1.5.2	OXA-23-like	34
1.5.3	OXA-24/40-like	35
1.5.4	OXA-58-like	35
1.5.5	OXA-143-like	36
1.6	Elementos genéticos móveis	37
1.6.1	IS <i>Aba</i>	38
1.6.2	Transposons	38
1.6.3	Plasmídeos	40
1.7	Deteção laboratorial de β -lactamases	40
1.8	Tipagem molecular para fins epidemiológicos	41
1.8.1	Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)	42
1.8.2	MLST	42
1.8.3	Sequenciamento de OXA-51-like	44
1.8.4	Trilocus Sequence Typing (3LST)	45
1.8.5	Trilocus Sequence Typing modificado por Martins et al. 2016 (m3LST)	46
2	OBJETIVOS	49
2.1	Objetivo geral	50
2.2	Objetivos Específicos	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	Desenho do estudo	52
3.2	Seleção da amostra	53
3.3	Identificação fenotípica	53

3.4 Extração do DNA bacteriano	53
3.5 Identificação das espécies de <i>Acinetobacter</i> por PCR, e sequenciamento da região ITS e dos genes <i>rpoB</i> e 16S rRNA.....	54
3.6 Detecção dos genes <i>bla_{OXA}</i> e <i>ISAba1</i>	57
3.7 Sequenciamento das variantes de OXA-51-like, OXA-24-like e OXA-143-like.....	59
3.8 Detecção dos genes de outras carbapenemases	62
3.9 Determinação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana	64
3.9.1 Determinação do perfil de susceptibilidade por disco-difusão	64
3.9.2 Determinação da do perfil de susceptibilidade por concentração inibitória mínima (CIM)	65
3.10 Avaliação da diversidade genética	66
3.10.1 Determinação do padrão eletroforético por PFGE	66
3.10.2 Tipagem dos clones de <i>A. baumannii</i> por 3LST (Turton et al., 2007)	68
3.10.3 Tipagem dos clones de <i>A. baumannii</i> por m3LST (Martins et al., 2016).....	71
3.10.4 Análise por Multilocus Sequence Typing (MLST)	73
4 RESULTADOS	76
4.1 Identificação molecular	80
4.2 Detecção das oxacilinases e Pesquisa de <i>ISAba1</i>	82
4.3 Sequenciamento das oxacilinases	84
4.4 Detecção das carbapenemases SPM, IPM, VIM, KPC, NDM e OXA-48.....	84
4.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana por disco-difusão	84
4.6 Teste de susceptibilidade por Concentração Inibitória Mínima (CIM)	85
4.7 Tipagem molecular por PFGE	87
4.8 Determinação Grupo Clonal pela técnica 3LST	90
4.8.1 Teste de 3LST segundo interpretação de Karah et al., 2012	90
4.8.2 Teste de m3LST segundo Martins et al., 2016	91
4.9 Tipagem molecular por MLST	93
5 DISCUSSÃO	100
6 CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
ANEXOS	139

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) constituem um grave problema de saúde pública global, com alto impacto nas taxas de morbidade, mortalidade, tempo de internação e custos associados aos cuidados ao paciente (Gulen et al., 2015; Maragakis e Perl, 2008). Esse prolongamento do tempo de permanência e dos cuidados a saúde prestados oneram não somente as instituições de saúde, mas a sociedade como um todo. Isso porque, além dos custos diretos da assistência, esse aumento no tempo de internação provoca redução da força de trabalho e de produção (Pereira et al., 2005; Silva, 2003).

As infecções hospitalares são definidas como infecções adquiridas durante o período de hospitalização do paciente, ou seja, não manifestadas ou incubadas no momento da admissão dele no hospital (<https://www.who.int>, em 25/06/2017) e são importante motivo de preocupação no mundo todo. Contudo, essas infecções não estão mais restritas aos hospitais, e por isso, nos últimos anos, têm sido renomeadas de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), pelo fato de ocorrerem em qualquer local onde se preste o cuidado e a assistência à saúde (Horan, Andrus e Dudeck, 2008).

Infelizmente, a ocorrência desse tipo de infecção tem ganhado cada vez mais espaço no cenário epidemiológico mundial, a ponto de, em 2002, o número de casos de IRAS exceder o número de notificações de qualquer outra doença nos Estados Unidos. Nessa ocasião, o número estimado de IRAS foi de 1,7 milhões, com mais de 98 mil mortes a elas associadas. (Klevens et al., 2007).

A Organização Mundial de Saúde publicou em 2014 que a frequência de IRAS em países desenvolvidos era de sete em cada 100 pacientes hospitalizados. Enquanto isso, em países em desenvolvimento, essa frequência aumentava para 10 em cada 100, ou seja, 10% dos pacientes hospitalizados (www.who.int/gpsc/country, acesso em 25/06/2017). O recente estudo de Fortaleza e colaboradores (2017) sustenta tal estatística, tendo em

vista que registrou a elevada prevalência de 10,8% de IRAS no Brasil considerando-se todas as regiões do país (Fortaleza et al., 2017). Já os *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) apontam que, nos Estados Unidos, um em cada 25 pacientes hospitalizados adquire ao menos uma infecção relacionada à assistência a saúde todos os dias. Os CDC também estimam que, por ano, cerca de 75.000 pacientes hospitalizados portadores de IRAS evoluam a óbito durante a internação nesse mesmo país (<https://www.cdc.gov/hai/surveillance/index.html>).

Diante desse contexto, é notável que o estudo e prevenção de IRAS, bem como de todos os fatores a elas relacionados, sejam indispensáveis para a eficiência e manutenção do propósito da assistência a saúde e segurança do paciente.

1.2 *Acinetobacter* spp.

Dentre os agentes mais relevantes em IRAS estão as espécies do gênero *Acinetobacter*, particularmente aquelas incluídas no denominado Complexo *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* (ACB) (Gulen et al., 2015). Os micro-organismos pertencentes a este gênero apresentam a morfologia de bacilos durante a fase de crescimento exponencial e de cocobacilos na fase estacionária, agrupados aos pares. São Gram-negativos, encapsulados, aeróbios estritos, indol-negativos, não-fermentadores de glicose, catalase-positivos, oxidase-negativos e imóveis (Perez et al., 2007).

O gênero *Acinetobacter* pertence à família Moraxellaceae, tendo sido isolado do solo e pioneiramente descrito por Beijerinck em 1911 sob a denominação de *Micrococcus calcoaceticus*. Apesar de Brisou e Prévot terem proposto em 1954 o termo *Acinetobacter* para o gênero, foi o estudo de Baumann e colaboradores em 1968 que resultou no reconhecimento oficial do gênero *Acinetobacter* (Lessel, 1971). Em 1986, Bouvet e Grimont descreveram 12 genoespécies de *Acinetobacter* pela técnica de hibridização DNA-DNA, incluindo *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter*

haemolyticus e *Acinetobacter junii*. Desde então, as nomenclaturas das diversas espécies do gênero sofreram consideráveis mudanças, tendo em vista o avanço dos métodos de identificação moleculares, os quais permitem cada vez maior discriminação entre microrganismos similares (Urban et al., 2003).

Atualmente o gênero *Acinetobacter* engloba 53 espécies com nomes válidos publicados, as quais foram definidas por método de DNA hibridizado, sequenciamento de 16S-rRNA e de genoma completo (<http://www.bacterio.net>, acesso em 24/09/2017) (Quadro I).

Quadro I- Espécies descritas de *Acinetobacter* até 2017 e suas respectivas publicações válidas

Espécie	Publicação
<i>Acinetobacter albensis</i>	Krizova et al. 2015, sp. nov
<i>Acinetobacter apis</i>	Kim et al. 2014, sp. nov.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Bouvet and Grimont 1986, sp. nov.
<i>Acinetobacter baylyi</i>	Carr et al. 2003, sp. nov.
<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	Nemec et al. 2009, sp. nov.
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	Nemec et al. 2010, sp. nov.
<i>Acinetobacter bohemicus</i>	Krizova et al. 2015, sp. nov.
<i>Acinetobacter boissieri</i>	Álvarez-Pérez et al. 2013, sp. nov.
<i>Acinetobacter bouvetii</i>	Carr et al. 2003, sp. nov.
<i>Acinetobacter brisouii</i>	Anandham et al. 2011, sp. nov.
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	(Beijerinck 1911) Baumann et al. 1968, species. (Type species of the genus.)
<i>Acinetobacter celticus</i>	Radolfova-Krizova et al. 2016, sp. nov.
<i>Acinetobacter courvalinii</i>	Nemec et al. 2016, sp. nov.
<i>Acinetobacter dispersus</i>	Nemec et al. 2016, sp. nov.

<i>Acinetobacter dijkshoorniae</i>	Cosgaya et al. 2016, sp. nov.
<i>Acinetobacter equi</i>	Poppel et al. 2016, sp. nov.
<i>Acinetobacter gandensis</i>	Smet et al. 2014, sp. nov.
<i>Acinetobacter gernerii</i>	Carr et al. 2003, sp. nov.
<i>Acinetobacter grimontii</i>	Carr et al. 2003, sp. nov.
<i>Acinetobacter guangdongensis</i>	Feng et al. 2014, sp. nov.
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	Nemec et al. 2010, sp. nov.
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	Nemec et al. 2009, sp. nov.
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	(ex Stenzel and Mannheim 1963) Bouvet and Grimont 1986, nom. rev., comb. nov.
<i>Acinetobacter harbinensis</i>	Li et al. 2014, sp. nov.
<i>Acinetobacter indicus</i>	Malhotra et al. 2012, sp. nov.
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Bouvet and Grimont 1986, sp. nov.
<i>Acinetobacter junii</i>	Bouvet and Grimont 1986, sp. nov.
<i>Acinetobacter kookii</i>	Choi et al. 2013, sp. nov.
<i>Acinetobacter lactucae</i>	Rooney et al. 2016, sp. nov.
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	(Audureau 1940) Brisou and Prévot 1954, species. .
<i>Acinetobacter modestus</i>	Nemec et al. 2016, sp. nov.
<i>Acinetobacter nectaris</i>	Álvarez-Pérez et al. 2013, sp. nov.
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	Nemec et al. 2011, sp. nov.
<i>Acinetobacter pakistanensis</i>	Abbas et al. 2015, sp. nov.
<i>Acinetobacter parvus</i>	Nemec et al. 2003, sp. nov.
<i>Acinetobacter pittii</i>	Nemec et al. 2011, sp. nov.
<i>Acinetobacter populi</i>	Li et al. 2015, sp. nov.

<i>Acinetobacter pragensis</i>	Radolfova-krizova et al. 2016, sp. nov.
<i>Acinetobacter proteolyticus</i>	Nemec et al. 2016, sp. nov.
<i>Acinetobacter puyangensis</i>	Li et al. 2013, sp. nov.
<i>Acinetobacter qingfengensis</i>	Li et al. 2014, sp. nov.
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Nishimura et al. 1988, sp. nov.
<i>Acinetobacter rudis</i>	Vaz-Moreira et al. 2011, sp. nov.
<i>Acinetobacter schindleri</i>	Nemec et al. 2001, sp. nov.
<i>Acinetobacter seifertii</i>	Nemec et al. 2015, sp. nov.
<i>Acinetobacter soli</i>	Kim et al. 2009, sp. nov.
<i>Acinetobacter tandoii</i>	Carr et al. 2003, sp. nov.
<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	Carr et al. 2003, sp. nov.
<i>Acinetobacter towneri</i>	Carr et al. 2003, sp. nov.
<i>Acinetobacter ursingii</i>	Nemec et al. 2001, sp. nov.
<i>Acinetobacter variabilis</i>	Krizova et al. 2015, sp. nov.
<i>Acinetobacter venetianus</i>	Vaneechoutte et al. 2009 ex Di Cello et al. 1997, sp. nov.
<i>Acinetobacter vivianii</i>	Nemec et al. 2016, sp. nov.

Fonte: site bacterio.net.

Entre as espécies classificadas, *Acinetobacter baumannii* é a de maior importância médica. *A. baumannii* assemelha-se muito a outras seis espécies de *Acinetobacter* e, apesar dos inúmeros métodos de identificação de micro-organismos, a distinção entre essas sete espécies ainda é complicada (Teixeira et al., 2017). Devido à dificuldade de distinção tanto fenotípica quanto genotípica dessas espécies, utiliza-se a terminologia Complexo *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* (ACB), principalmente na área médica, para discriminar estas espécies. Este Complexo compreende as espécies: *A. pittii*, *A.*

calcoaceticus, *A. nosocomialis*, *Acinetobacter* between 1 and 3, *Acinetobacter seifertii*, *Acinetobacter dijkshoorniae* e *A. baumannii* (Cosgaya et al., 2016, Gulen et al., 2015, Nemec et al., 2015).

As espécies pertencentes ao Complexo ACB são encontradas no meio ambiente e têm caráter oportunista. São capazes de se conservar em superfícies inanimadas por até cinco meses (Kramer et al., 2006), resistirem à desinfecção tanto por produtos químicos quanto por luz ultravioleta, à dessecação e possuem determinantes de resistência intrínsecos e adquiridos contra diversas classes de antimicrobianos (Bonomo e Szabo, 2006; Cherkaoui et al., 2015; Fournier, Richet e Weinstein, 2006; Karageorgopoulos e Falagas, 2008).

Estes patógenos têm sido ranqueados entre os organismos mais perigosos para as instituições de saúde no mundo, sendo a causa de inúmeros surtos infecciosos e também de contaminações endêmicas em unidades de saúde no mundo todo (Fournier, Richet e Weinstein, 2006; Maragakis e Perl, 2008).

Estão relacionadas a *Acinetobacter* infecções de pele e tecidos moles, infecções do trato urinário, meningites secundárias, infecções envolvendo ossos e, principalmente, pneumonias associadas a sistemas de ventilação mecânica (VAP) e infecções da corrente sanguínea (Higgins et al., 2010; Peleg, Seifert e Paterson, 2008). Essas infecções são mais frequentes em pacientes em estado grave ou imunocomprometidos, especialmente naqueles internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (Higgins et al., 2010), nos quais pode atingir o preocupante nível de 65,5% de mortalidade em infecções de corrente sanguínea primárias (Marra et al., 2011). Foi verificado que infecções por *Acinetobacter* spp. aumentam em 50% o risco de morte de pacientes graves com bacteremias internados em UTIs comparado a pacientes em situação semelhante, porém com bacteremias causadas por outros patógenos (Leão et al., 2016).

No Brasil, no ano de 2015, *Acinetobacter* spp. ocuparam a quarta posição entre os patógenos mais frequentemente isolados de Infecções de

Corrente Sanguínea primária de pacientes adultos hospitalizados em UTIs de todas as regiões do país (Anvisa, 2016 nº14). Os CDC estimam que 12.000 IRAS causadas por *A. baumannii* ocorram anualmente e que aproximadamente 63% destes isolados sejam multirresistentes (CDC, 2013).

1.3 Resistência antimicrobiana em *Acinetobacter*

A resistência aos antimicrobianos apresentada por *A. baumannii* inclui a resistência intrínseca às aminopenicilinas, às cefalosporinas de primeira e segunda geração, ao cloranfenicol e ao ertapenem (CLSI, 2017). Este patógeno tem, ainda, a capacidade de adquirir muito rapidamente mecanismos de resistência a outros fármacos, como os β -lactâmicos de espectro estendido, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclinas (Bonomo e Szabo, 2006; Karageorgopoulos e Falagas, 2008). Estes mecanismos são manifestados por alterações nas estruturas bacterianas, como a diminuição da permeabilidade da membrana externa (por meio da perda de porinas), alteração das proteínas ligadoras de penicilina (*penicilin binding proteins*, PBP), alteração do sítio-alvo, superexpressão de bombas de efluxo e síntese de enzimas hidrolíticas.

Dessa forma, a emergência maciça de linhagens de *Acinetobacter* multirresistentes (MR), ou seja, resistentes a mais de duas classes de drogas dentre cefalosporinas antipseudomonas, carbapenêmicos antipseudomonas, ampicilina-sulbactam, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (Magiorakos et al., 2012), vem esgotando as opções de tratamento de infecções causadas por esse patógeno. Durante muitos anos, os carbapenêmicos imipenem e meropenem, pertencentes à classe dos β -lactâmicos, foram um dos poucos antimicrobianos com efetividade contra *A. baumannii* MR. No entanto, a resistência aos carbapenêmicos tem se tornado cada vez mais relevante no meio hospitalar, tendo sido relatada pela primeira vez na cidade de São Paulo na década de 1990 (Levin et al., 1996, Sader et al., 1996). O aumento expressivo da resistência em *A. baumannii* aos carbapenêmicos é descrito em diversos lugares do mundo (Gales et al., 2011; Karageorgopoulos e Falagas,

2008; Poirel e Nordmann, 2006; Prado et al., 2014; Su et al., 2012, Waheram et al., 2008), inclusive no Brasil (Gales et al., 2012; Rossi, 2011; Schmith Bier et al.; 2010; Teixeira et al., 2013). Taxas de resistência superiores a 50% são documentadas em países europeus e ainda nos Estados Unidos, China, Índia, Coreia do Sul e outros, incluindo o Brasil (Figura 1).

Figura 1. Epidemiologia global de *Acinetobacter* resistente a carbapenêmicos
 Fonte: Kim et al. 2014

No estado de São Paulo, de acordo com dados do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde (CVE), a partir de 2008 a incidência de isolados de *A. baumannii* com resistência ao imipenem superou a de isolados sensíveis e atingiu o alarmante nível de 85% em 2016 (Centro de Vigilância Epidemiológica, 2017). Em 2012, segundo a Anvisa, 77,1% dos

isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes de Infecções de Corrente Sanguínea primária de pacientes adultos hospitalizados em UTIs de todas as regiões geográficas do Brasil eram resistentes aos carbapenêmicos (Anvisa, 2014).

Esta diminuição nas opções terapêuticas demanda a necessidade de investigação da sensibilidade a outras drogas, como tigeciclina, polimixina B, colistina, minociclina, ampicilina-sulbactam, sulbactam, e tetraciclina, as quais podem ainda apresentar atividade contra cepas MR (Fishbain e Peleg, 2010; Karageorgopoulos e Falagas, 2008; Peleg e Patterson, 2006), e de explorar outros métodos de tratamento, como uso de terapia combinada (Leite et al., 2016). Tal necessidade mostra-se ainda mais clara pelo fato de que o tratamento inicial adequado das bacteremias por *Acinetobacter* impacta diretamente no desfecho das infecções e na sobrevida dos pacientes (Leão et al., 2016).

1.4 Mecanismos de resistência a carbapenêmicos

A resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* pode ser devida à perda de porinas da membrana externa, superexpressão de bombas de efluxo, alteração em proteínas ligadoras de penicilina e produção de enzimas hidrolíticas. Dentre esses mecanismos, o mais importante é a produção de enzimas hidrolíticas β -lactamases (Helfand e Bonomo, 2003). Os fármacos β -lactâmicos possuem em sua estrutura química um anel β -lactâmico, e têm como mecanismo de ação a inibição de enzimas transpeptidases, responsáveis pelo estágio final da síntese de parede celular bacteriana (Rossi e Andreazzi, 2005). As enzimas β -lactamases promovem a hidrólise do anel β -lactâmico (Bush e Jacoby, 2010), inativando, dessa forma, a ação do antimicrobiano sobre a síntese da parede celular bacteriana.

Tais enzimas podem ser divididas em quatro classes (A, B, C, D) de acordo com suas características estruturais (classificação de Ambler, 1980), ou em três grupos (1, 2, 3) pelas suas diferentes capacidades hidrolíticas e perfis

de inibição por inibidores de β -lactamases (classificação funcional) (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995) (Quadro II). A origem dessas enzimas pode ser intrínseca ou adquirida. *A. baumannii*, por exemplo, detém intrinsecamente AmpC (uma β -lactamase da classe C de Ambler) e OXA-51-like (enzimas da classe D) codificadas cromossomicamente (Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Perez et al., 2007; Turton et al., 2006). Outras oxacilinases (codificadas pelos genes *bla_{OXA}*) são intrínsecas a diferentes espécies de *Acinetobacter*, como a OXA-134a em *A. lwoffii* e OXA-23 em *A. radioresistens*, por exemplo (Figueiredo et al., 2010; Nigro e Hall, 2016; Poirel et al., 2008).

Entre as enzimas hidrolíticas transferíveis encontradas em *Acinetobacter*, estão algumas metalo- β -lactamases da classe B de Ambler (IPM-like, VIM-like, NDM-1,2 e SIM-1) e também as β -lactamases hidrolíticas de carbapenem da classe D de Ambler (carbapenem-hydrolising class D β -lactamases, CHDL) (Quadro II) (Kaase et al., 2011; Pfeifer et al., 2011; Poirel e Nordman, 2008). As CHDL compreendem um grupo de grande importância clínica, tendo em vista que podem ter origem tanto intrínseca como adquirida e que, diferentemente das metalo- β -lactamases, são comumente encontradas na espécie *A. baumannii* (Lee et al., 2009; Queenan e Bush, 2007).

Quadro II: Classificação comparativa das β -lactamases de acordo com Bush, Jacoby e Medeiros (2010) e Ambler (1980). Em destaque, as OXA-enzimas.

Classificação Bush, Jacoby e Medeiros (2010)		Classificação de Ambler (1980)	Substrato	Representantes
Grupo Funcional	Subgrupo	Classe Molecular		
1		C	Cefalosporinas	AmpC (ACT-1, FOX, MIR-1, CMY-2, etc)
2	2a	A	Penicilina	PC1
	2b	A	Penicilinas e cefalosporinas de 1ª e 2ª geração	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	A	Cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	ESBL (TEM-3, SHV-2, CTXM-15, PER-1, VEB, etc)
	2br	A	Penicilina	TEM-30, SHV-10
	2ber	A	Cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	TEM 50 (CTM-1)
	2c	A	Carbenicilina	PSE-1, CARB-3
	2ce	A	Carbenicilina e cefepime	RTG-4
	2d	D	Oxacilina	OXA-1, OXA-10
	2de	D	Oxacilina e cefalosporinas de espectro estendido	OXA-11, OXA-15
	2df	D	Oxacilina e carbapenêmicos	OXA-23, OXA-253, OXA72, OXA-231, etc
	2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido	CepA
	2f	A	Carbapenêmicos	KPC, IMI-1, SME, GES- 3, GES-4, GES-5
3	3a	B	Carbapenêmicos	IMP, VIM, SPM, IND, NDM
	3b	B	Carbapenêmicos	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ- 1, CphA, Sfh1

1.5 Oxacilinases CHDL

Essas enzimas eram, inicialmente, penicilinasas com o diferencial de também hidrolisar oxacilinas e que, devido a inúmeras mutações, tornaram-se capazes de conferir resistência aos carbapenêmicos. Ainda que a capacidade hidrolítica delas seja considerada reduzida quando comparada às carbapenemases pertencentes à classe A e B de Ambler, sua presença é fundamental ao fenótipo de resistência, principalmente quando associadas a outros mecanismos, como bombas de efluxo e alterações de proteínas ligadoras de penicilina (Evans e Amyes, 2014; Hu et al., 2007; Lee et al., 2017).

Existem cinco subgrupos principais de oxacilinases associadas à resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*: OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-143-like e OXA-58-like.

1.5.1 OXA-51-like

Oxacilinases do tipo OXA-51-like são intrínsecas a espécie *A. baumannii* (Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Turton et al., 2006) e sua detecção é utilizada como método de identificação dessa espécie. Entretanto, não somente algumas variantes dessa oxacilinase já foram pontualmente identificadas nas espécies *Acinetobacter nosocomialis* e na espécie *Acinetobacter seifertii*, como também as enzimas OXA-51-like já foram detectadas em plasmídeos (Chen et al., 2010; Lee et al., 2012; Saranathan et al. 2014). Portanto, para garantir a identificação precisa da espécie *A. baumannii*, a utilização de uma técnica complementar de identificação molecular é desejável (Lee et al., 2009).

O grupo OXA-51-like é o grupo com maior número de variantes de oxacilinases existente, e teve sua primeira enzima representante, a OXA-51, identificada pioneiramente em 2005 em amostras de *A. baumannii* provenientes da Argentina, isolados em 1996 (Brown, Young e Amyes, 2005). O grande número de variantes existentes nesse grupo pode ser um indicativo de que estas enzimas estejam sendo submetidas à pressão seletiva de

antimicrobianos, fato que as relacionaria à resistência antimicrobiana em *Acinetobacter baumannii* (Evans e Amyes, 2014). Estudos apontam que algumas enzimas OXA-51-like detêm capacidade hidrolítica a carbapenêmicos, embora pouco potente e secundária se comparada a outros mecanismos de resistência e, principalmente, a outras oxacilinases (Brown, Young e Amyes, 2005; Héritier et al., 2005; Hu et al., 2007). Estudos sugerem que essa resistência se dê somente nas ocasiões em que o gene *bla*_{OXA-51-like} apresente a sequência de inserção *ISAba1* à montante. Este elemento atua como promotor e desencadeia a superexpressão da carbapenemase. Tal fato é bastante preocupante, pois possibilita que, de alguma forma, todos os isolados de *A. baumannii* venham a desenvolver alguma resistência aos carbapenêmicos, embora existam relatos de *ISAba1* à montante do gene *bla*_{OXA-51-like} em isolados sensíveis a carbapenêmicos (Turton et al., 2006; Pagano et al., 2012; Evans e Amyes, 2014).

1.5.2 OXA-23-like

Mais importantes que as enzimas OXA-51-like no que diz respeito à resistência antimicrobiana, são as enzimas do grupo OXA-23-like, por serem adquiríveis e transferíveis, altamente prevalentes no mundo todo e encontradas em todos os continentes (Mugnier et al., 2010; Nigro e Hall, 2015; Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Poirel e Nordmann, 2015), sendo a enzima prevalentemente circulante em isolados brasileiros (Carvalho et al., 2009; Fonseca et al., 2013) (Figura 2).

OXA-23 foi descrita no ano de 1993 em Endimburgo, sendo a primeira oxacilinase a conferir resistência a imipenem identificada em *A. baumannii* no mundo (Paton et al., 1993). Nos anos seguintes, outros tipos de OXA-enzimas resistentes a carbapenêmicos foram identificadas na França e Espanha (Hornstein et al., 1997; Vila et al., 1997), com similaridade estrutural à OXA-23, dando origem ao grupo OXA-23-like. O fato de diversos genes codificadores de OXA-23 terem sido encontrados no cromossomo de isolados de *Acinetobacter*

radioresistens indica que essa espécie é provável fonte natural desse grupo enzimático, tendo possivelmente transferido esses genes para *A. baumannii* horizontalmente (Mendes et al., 2009; Nigro e Hall, 2016; Poirel et al., 2008).

1.5.3 OXA-24/40-like

Menos frequentes em nosso meio são as enzimas do grupo OXA-24/40-like (recorrente em Portugal, Espanha, Bélgica, Estados Unidos e alguns países asiáticos). A enzima OXA-24 foi identificada pela primeira vez em 1997, na Espanha, em isolados de um surto de *A. baumannii*. Posteriormente, essa mesma oxacilinase foi erroneamente classificada como uma nova variante, OXA-40, e já foi detectada em plasmídeos de outras espécies de *Acinetobacter* e também de enterobactérias (Evans e Amyes, 2014). No Brasil, uma variante do grupo OXA-24/40-like foi primeiramente detectada em um isolado de *A. baumannii* de 2007 em São Paulo, identificada como OXA-72 (Werneck et al., 2011a). Desde então, tem-se observado a emergência dessa variante no Brasil, registrando-se sua identificação nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Pernambuco, Rio Grande do Sul e Paraná, com relatos de disseminação inter-hospitalar de *A. baumannii* carreador de OXA-72 em São Paulo (Carvalho et al., 2015; de Sá Cavalcanti et al., 2013; Martins e Barth, 2013; Pagano et al., 2017; Vasconcelos et al., 2015; Werneck et al., 2011a) (Figura 2).

1.5.4 OXA-58-like

A primeira cepa de *A. baumannii* carreadora de OXA-58 foi isolada em 2003 na França e, atualmente, esse grupo de oxacilinasas se distribui em alguns países da Europa, pelo Kwait, Paquistão, Austrália, China, Estados Unidos, Argentina e Bolívia (Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Poirel et al., 2005; Sevillano et al., 2012; Wu et al., 2015). No Brasil, a OXA-58 foi pontualmente detectada, pioneiramente, em 2010 em isolados de São Paulo, e

posteriormente em 2011 na cidade do Rio de Janeiro e em dois isolados de 1993 e 1997 em São Paulo (Antonio et al., 2009; Figueiredo et al., 2011). Mais recentemente, o trabalho de Narciso e colaboradores (2017) identificou um isolado de *A. seifertii* carreador de OXA-58 colonizando um cisne-de-pescoço-negro no Zoológico de São Paulo (Narciso et al., 2017). Esse pequeno grupo de oxacilinases parece deter por si só pouca capacidade hidrolítica, necessitando, então, estar associado a outros mecanismos de resistência (como bombas de efluxo) para conferir a *Acinetobacter* spp. resistência aos carbapênemicos (Evans e Amyes, 2014).

1.5.5 OXA-143-like

As enzimas OXA-143-like possuem distribuições geográficas mais definidas (Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Potron, Poirel e Nordmann, 2015). A primeira representante do grupo foi pioneiramente descrita no Brasil em 2004 na região metropolitana de São Paulo (Antonio et al., 2011; Higgins et al., 2009, Mostachio et al., 2012) e está restrita ao nosso país, Coréia do Sul, Honduras e Estados Unidos (Evans e Amyes, 2014; Zander et al., 2014). Especificamente no Brasil, variantes dessa enzima foram detectadas em diferentes localidades, como OXA-231 no Paraná, na cidade de São Paulo (Camargo et al., 2016; Gionco et al., 2012), Rio de Janeiro (Werneck et al., 2011b) e Minas Gerais (Medeiros e Lincopan, 2013) e OXA-253 em Belo Horizonte (Girlich et al., 2014) e Recife (de Sá Cavalcanti et al., 2016) (Figura 2). Assim, *bla*_{OXA-143-like} é tido como o segundo gene codificador de CHDL mais frequentemente identificado em isolados brasileiros de *Acinetobacter*, embora seja mais frequentemente encontrado na região sudeste do país (Pagano, Martins e Barth, 2016; Vasconcelos et al., 2015).

Figura 2. Distribuição dos grupos de enzimas oxacilinases pelos diferentes estados brasileiros. Baseado em Medeiros e Lincopan (2013) com atualizações (Carvalho et al., 2015; de Sá Cavalcanti et al., 2016; de Sá Cavalcanti et al., 2013; Girlich et al., 2014; Martins e Barth, 2013; Pagano et al., 2017)

1.6 Elementos genéticos móveis

Tendo em vista as múltiplas e divergentes distribuições das diversas oxacilinases pelo globo, identificar o tipo de enzima circulante tem grande importância epidemiológica para avaliar a disseminação deste determinante de resistência e propor medidas para sua contenção ou eliminação. As oxacilinases podem estar associadas a elementos genéticos móveis, como ilhas de resistência, integrons, transposons e sequências de inserção. Essas últimas desempenham um papel bastante relevante na resistência em *Acinetobacter*, pois induzem a superexpressão das carbapenemases, tornando a ação hidrolítica dessas enzimas suficientemente capazes de conferir a esses

patógenos a característica de resistência (Higgins et al., 2010; Pagano et al., 2016a).

1.6.1 IS*Aba*

O elemento de inserção IS*Aba1* é o mais prevalente em *A. baumannii* (Villalón et al., 2013), já tendo sido, nessa espécie, encontrado a montante dos genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{AmpC} (Pagano, Martins e Barth, 2016). Esse elemento possui ação de promotor quando encontrado à montante dos genes codificadores de enzimas hidrolíticas, induzindo a sua superexpressão (Turton et al., 2006). Outros elementos de inserção, como IS*Aba2*, IS*Aba3* (associados a *bla*_{OXA-58-like}) e IS*Aba4* (associado a *bla*_{OXA-23-like}) já foram identificados à montante de gene *bla*_{OXA} em espécies de *Acinetobacter*, porém menos frequentemente (Poirel e Nordmann, 2006).

1.6.2 Transposons

Além de promover superexpressão genética, as sequências de inserção contribuem para a mobilização de genes de carbapenemases entre as espécies de *Acinetobacter*. Diferentes arranjos e tipos de IS*Aba* à montante e à jusante dos genes *bla*_{OXA} de *Acinetobacter* permitem caracterizar os transposons, elementos genéticos móveis que contribuem substancialmente para a disseminação desses genes de resistência (Poirel, Bonnin e Nordmann, 2011). Cinco transposons estão relacionados ao gene *bla*_{OXA-23}: Tn2006, Tn2007, Tn2008, Tn2008*b* e Tn2009. Os transposons Tn2006 e Tn2009 são ditos compostos, ou de classe I, pois estão flanqueados tanto a montante quanto a jusante por IS*Aba1*, enquanto os Tn2008 e Tn2008*b* apresentam a sequência de inserção apenas a montante do gene *bla*_{OXA-23} (Nigro e Hall, 2016) (Figura 3). Desses, Tn2006 é o transposon mais comum entre *A. baumannii* (Lee, Chang e Su, 2012). O Tn2007, da mesma maneira que os Tn2008 e Tn2008*b*, possui a sequência de inserção somente a montante do

gene *bla*_{OXA-23}, sendo esta do tipo IS*Aba4*, diferentemente dos demais. Entretanto, ainda não existem evidências de que o Tn2007 detenha de fato capacidade de mobilização (Nigro e Hall, 2016).

Figura 3. Estrutura dos cinco transposons carreadores do gene *bla*_{OXA-23}, em *Acinetobacter baumannii*. O gene *bla*_{OXA-23} e *oxaAr* são representados pelas setas azuis; os elementos de inserção IS*Aba1*, pelos blocos verdes e IS*Aba4*, pelo bloco laranja. Por último, para fins comparativos, o ambiente genético do gene intrínseco *bla*_{OXA-23} (aqui também denominado *oxaAR*) em *A. radioresistens* é apresentado.

Fonte: Nigro e Hall, 2016

A princípio, os genes codificadores de OXA-24/40-like, OXA-58-like e OXA-143-like não estão associados a transposons. Enquanto *bla*_{OXA-58-like} associa-se a sequências de inserção como IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3* e IS18, o gene *bla*_{OXA-24/40-like} geralmente está flanqueado por recombinases do tipo XerC/XerD (Merino et al., 2010; Pagano et al., 2016a, Saavedra et al., 2014). Os genes codificadores de OXA-143-like, por sua vez, encontram-se ladeados por duas cópias de um mesmo gene codificador de proteína replicase, sugerindo o envolvimento de um processo de recombinação homóloga na aquisição desse gene (Gionco et al., 2012). Entretanto, alguns genes *bla*_{OXA-51-}

like encontrados em plasmídeos parecem estar alocados em um transposon denominado Tn6080, porém pouco se sabe sobre o impacto de sua disseminação (Chen et al., 2010).

1.6.3 Plasmídeos

Plasmídeos são elementos de dupla fita de DNA circulares extra-cromossomais existentes em bactérias com um mecanismo de replicação próprio. São importantes contribuintes da variabilidade genética, pois promovem a transferência horizontal de genes entre populações bacterianas por conjugação ou transformação, mesmo entre bactérias pertencentes a gêneros distintos. É por meio deste mecanismo que os plasmídeos comportam-se como importantes veículos da disseminação da resistência a antimicrobianos (Carattoli et al., 2005; Carattoli, 2009).

Os plasmídeos são classificados pelos Grupos de Incompatibilidade (Incompatibility Groups, Inc), partindo do princípio que aqueles com o mesmo controle do mecanismo de replicação são ditos “incompatíveis”. Isso porque é inviável que dois plasmídeos pertencentes ao mesmo Grupo de Incompatibilidade sejam propagados em uma mesma linhagem bacteriana (Carattoli et al., 2005). A classificação dos plasmídeos faz-se importante a fim de se analisar sua distribuição pelo mundo, bem como sua relação com a célula hospedeira e suas origens evolutivas. Essa análise é fundamental para a compreensão da adaptação de comunidades microbianas aos diversos ambientes e para o uso dos plasmídeos como ferramentas genéticas na engenharia microbiana (Carattoli, 2009; Shintani, Snchez e Kimbara, 2015; Smalla Jechalke e Top, 2015).

1.7 Detecção laboratorial de β -lactamases

Para detecção das β -lactamases, abordagens fenotípicas ou genotípicas podem ser empregadas. Para as enzimas do tipo oxacilinases, particularmente, não existem testes fenotípicos para sua detecção, diferentemente do já bem

estabelecido teste para detecção de β -lactamases de espectro estendido (extended spectrum β -lactamases, ESBL) (inibidas por clavulanato e tazobactam) e de metalo- β -lactamases (MBL) (inibidas por EDTA e compostos derivados de tiol) (Quadro II; Bush e Jacoby, 2010). Dessa maneira, a identificação molecular dessas enzimas é exclusivamente realizada por meio de métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Evans e Aymes, 2014). Essa técnica é altamente específica e sensível e consiste na amplificação *in vitro* de uma determinada sequência genética alvo por meio do uso de iniciadores (*primers*) específicos, mimetizando a reação de duplicação de DNA que ocorre *in vivo*. Uma abordagem multiplex da técnica de PCR foi proposta há alguns anos para detecção simultânea dos genes das principais famílias de OXA-enzimas reconhecidas até então (Woodford et al., 2006) e atualizada posteriormente (Higgins, Lehmann e Seifert, 2010).

Ainda assim, o sequenciamento dos grupos de OXA-enzimas é o único método que permite realmente definir os alelos de oxacilinases dentro dos grupos identificados por PCR.

O sequenciamento das OXA-enzimas também é útil na identificação das variantes dos demais grupos de oxacilinases, como OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24/40-like e OXA-143-like. Essa técnica permite mapear quais alelos circulam em determinadas regiões, como OXA-23 do grupo OXA-23-like no Brasil, por exemplo (Camargo et al., 2016; Carvalho et al., 2009; Grosso et al., 2011; Rossi, 2011).

A caracterização das OXA-enzimas responde a algumas questões epidemiológicas que podem ser complementadas com outras ferramentas de tipagem molecular que permitem o rastreamento de diferentes cepas, diferentes subgrupos enzimáticos e de diferentes perfis de resistência.

1.8 Tipagem molecular para fins epidemiológicos

O conhecimento da similaridade dos isolados e a determinação do tipo de enzima associada ao fenótipo de resistência são fundamentais para

caracterização da emergência ou disseminação de determinado mecanismo ou perfil de resistência aos antimicrobianos em amostras clínicas no mundo todo. Para isso, o emprego de técnicas moleculares no estudo epidemiológico de micro-organismos permitiu a determinação dos perfis genéticos existentes e a comparação entre perfis mundiais.

1.8.1 Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

Para estudos em um contexto mais definido, como a caracterização de surtos em ambiente hospitalar, a técnica de eletroforese em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) é uma das mais indicadas (Tenover et al., 1997; Towner et al., 2008). O PFGE consiste na digestão do DNA cromossômico do micro-organismo por enzimas com quantidade limitada de sítios de restrição, seguida por uma eletroforese em campo pulsado. Essa eletroforese tem como diferencial seu campo elétrico, o qual é periodicamente alterado em sua direção e/ou intensidade. Tal particularidade permite a separação de moléculas de DNA maiores que 12 Mb, em contraste com a eletroforese unidirecional, a qual limita-se a separação de fragmentos de até 50 kb (Dijkshoorn, Towner e Struelens, 2001).

A técnica de PFGE é considerada o padrão-ouro no estudo epidemiológico de bactérias (Finney, 1993) e, apesar de seu alto poder discriminatório, pois utiliza-se do DNA cromossômico bacteriano total, tem como limitação a reprodução e comparação dos resultados interlaboratorialmente.

1.8.2 MLST

Para estudos globais, a técnica de sequenciamento por tipagem multi-locus (*multilocus sequence typing*, MLST) é, atualmente, a mais empregada, por garantir a reprodutibilidade e a possibilidade de comparação

interlaboratorial por meio de banco de dados mundiais (armazenados em MLST.net ou no banco de dados do Instituto Pasteur, por exemplo, para espécies de *Acinetobacter*). Esta técnica consiste na amplificação e sequenciamento de fragmentos (*loci*) de sete genes estruturais bacterianos. A partir da combinação dos diferentes alelos dos sete *loci* sequenciados, é definido um tipo de sequência bacteriana, ou *sequence type* (ST), o qual pode ser considerado como uma “impressão digital” do micro-organismo em questão. A determinação dos STs possibilita o agrupamento das bactérias em grupos representativos de complexos clonais (CC), isto é, STs que compartilham um número definido de alelos idênticos, permitindo o reconhecimento de clones (Woodford, Turton e Livermore, 2011). Para pertencerem a um mesmo CC, os STs devem ter em comum no mínimo seis de sete alelos entre ao menos um membro deste grupo, ou seja, apresentar a variação de um *loci*, ou *single loci variation* (SLV). Quando a variação entre dois STs é de dois *loci*, diz-se *double loci variation* (DLV). A análise dos resultados de MLST é realizada através da plataforma online eBURST, cujos algoritmos traçam diagramas do tipo *minimum-spanning-tree* a fim de, por similaridade genética, organizar as cepas em complexos clonais.

Existem dois protocolos de MLST para *A. baumannii*, o Esquema de Bartual (ou também denominado Oxford) e do Instituto Pasteur (Bartual et al., 2005; Diancourt et al., 2010), os quais analisam apenas três *loci* em comum: *gltA*, *recA* e *cpn60*. Apesar de ambos utilizarem-se de sete genes constitutivos e permitirem a análise global dos dados, o protocolo de Oxford tende a ser mais discriminatório quando comparado ao do Instituto Pasteur, especialmente referente aos STs pertencentes ao CC2. Esse fato está associado à alta variabilidade dos genes *gpi* e *gyrB* analisados somente no Esquema de Bartual. Contudo, tal variabilidade pode estar associada à alta taxa de recombinação desses genes, devido a posição em que se encontram no cromossomo de *A. baumannii* (Tomascheck et al., 2016). A localização dos genes envolvidos no protocolo de Oxford é também uma questão quanto à representatividade do genoma bacteriano, pois todos os genes envolvidos nesse protocolo encontram-se em uma única metade do cromossomo de *A.*

baumannii. Além disso, uma análise feita por Hamidian, Nigro e Hall em 2017 revelou que parte de um dos *primers* utilizados no sequenciamento do gene *gpi* estava sendo incorporado à região de determinação do alelo deste gene, acarretando em STs inexistentes. Dessa maneira, o esquema do Instituto Pasteur oferece uma melhor representatividade do genoma bacteriano pelo fato de os genes envolvidos neste protocolo localizarem-se em ambas as metades do cromossomo de *A. baumannii*. Além disso, os genes que apresentam altas taxas de recombinação no esquema de Oxford não estão incluídos no protocolo do Instituto Pasteur, o que confere a este maior assertividade quanto aos resultados (Tomaschek et al., 2016).

A estrutura populacional de isolados clínicos de *A. baumannii* é dividida, majoritariamente, em três linhagens clonais no cenário internacional, conhecidas como Clone Internacional I (IC1), Clone Internacional II (IC2) e Clone Internacional III (IC3). Esses complexos clonais são circulantes principalmente na Europa e correspondem, respectivamente, aos complexos clonais CC (e sequências tipo - ST) CC1 (ST1, ST7, ST8, ST19 e ST20), CC2 (ST2, ST45, ST47) e CC3 (ST3 e ST14), segundo protocolo do Instituto Pasteur (Martins et al., 2016). Entretanto, a distribuição dos complexos clonais não é homogênea ao redor do globo e, em determinadas regiões, a epidemiologia difere quanto a circulação de IC1, IC2 e IC3. No Brasil, por exemplo, registra-se muito pouco o IC2 e menos ainda o IC3, enquanto o IC1 é amplamente disseminado, especialmente tratando-se do complexo clonal CC1, além dos complexos CC79, CC15 e CC25 (Camargo et al., 2016; Chagas et al. 2014; Martins et al., 2016; Vaconcelos et al., 2015; Woodford, Turton e Livermore, 2011).

1.8.3 Sequenciamento de OXA-51-like

Outro método empregado para a identificação das linhagens clonais de *A. baumannii* é o sequenciamento das enzimas intrínsecas OXA-51-like. Isso porque as variantes de OXA-51-like mostram-se satisfatoriamente conservadas

dentro dos vários grupos clonais, estabelecendo, assim, uma boa correlação com os resultados obtidos por MLST (Pournaras et al., 2014) (Quadro III). Todavia, o fato dessas enzimas já terem sido identificadas em plasmídeos e em espécies de *Acinetobacter* não-*baumannii* configura uma limitação a ser considerada em relação a esse método (Chen et al., 2010; Saranathan et al., 2014).

1.8.4 Trilocus Sequence Typing (3LST)

O teste de PCR multiplex 3LST (Turton et al., 2007) é indicado para rotinas laboratoriais em locais com recursos limitados e em estudos com grande amostragem. Isso porque permite inferir o grupo clonal dos isolados de maneira mais rápida e econômica que o método tradicional de MLST, por ser baseada na simples tipagem por PCR sem a necessidade da técnica de sequenciamento. Essa inferência se dá pelas diferentes combinações de bandas amplificadas ou não dos genes de formação de biofilme (*csuE*), de proteína de membrana externa (*ompA*) e do gene codificador de OXA-51-like (*bla_{OXA51-like}*). O 3LST constitui-se de duas reações multiplex de PCR, uma para o Grupo 1 e outra para o Grupo 2 e, desde sua formulação, houve a expansão do seu leque de interpretações, que originalmente foi delineado para identificar apenas os IC1, IC2 e IC3 (Turton et al., 2007). O trabalho de Karah e colaboradores (2012), por exemplo, compilou a classificação de isolados em até 14 grupos a partir da combinação dos resultados propostos pela técnica original (Karah et al., 2012).

Pelo fato de dispensar a etapa de sequenciamento, essa técnica é simples e de baixo custo, o que faz dela bastante acessível. Outra vantagem é que, da mesma maneira que o MLST, o PCR multiplex 3LST permite a associação dos seus resultados com os clones mais disseminados mundialmente (IC1, IC2 e IC3) (Turton et al., 2007).

1.8.5 Trilocus Sequence Typing modificado por Martins et al. 2016 (m3LST)

Entretanto, o estudo original de Turton e colaboradores (2007) contemplava apenas a identificação dos três primeiros Grupos Clonais, que podem não ser os predominantes em determinados cenários, como o brasileiro. Além disso, há limitação e falta de evidências em relação aos grupos estabelecidos pela interpretação compilada por Karah e colaboradores em 2012.

Frente a isso, Martins e colaboradores propuseram em 2016 um novo esquema de tipagem clonal por 3LST, baseado nos mesmo genes do protocolo original. Esse esquema foi especialmente adequado à realidade brasileira, tendo em vista que o método Turton e colaboradores (2007) detectava apenas um Complexo Clonal CC1 dos quatro clones mais prevalentes no país (CC1, CC79, CC15 e CC25) e que no Brasil os Clones Internacionais IC2 e IC3 são pouco disseminados (Martins et al., 2016).

Este método resume-se em uma única reação de PCR multiplex também baseada na amplificação dos genes de formação de biofilme (*csuE*), de proteína de membrana externa A (*ompA*) e do gene codificador de OXA-51-like (*bla_{OXA-51-like}*), dispensando a etapa de sequenciamento. Tal método foi recentemente validado pelo trabalho de Vasconcellos e colaboradores em amostragem maior e mais diversificada (Vasconcellos et al., 2017a). A relação entre os alelos do gene *bla_{OXA-51-like}*, clones internacionais, grupos clonais e complexo clonal é apresentada no Quadro III (Pournaras et al., 2014; Zarrilli et al., 2013).

Quadro III- Correspondência entre as classificações de clonalidade em Clone Internacional, Grupo Clonal e Complexo Clonal.

Alelo <i>bla</i>_{OXA-51-like} (Pournaras et al. 2016)	CC (Pournaras et al. 2016)	Principais ST (Pournaras et al. 2016)	3-LST (Karah et al. 2012)	Clone Internacional (Karah et al. 2012)
<i>bla</i> _{OXA-66}	CC2	ST2 ST45	G1	IC2
<i>bla</i> _{OXA-69}	CC1	ST1 ST20	G2	IC1
<i>bla</i> _{OXA-71}	CC3	ST3	G3	IC3
<i>bla</i> _{OXA-64}	CC25	ST25	G4	
<i>bla</i> _{OXA-90}	Perfil único	ST78	G6	
<i>bla</i> _{OXA-94}	CC6	ST85	NC	
<i>bla</i> _{OXA-365}	CC54	ST54	NC	
<i>bla</i> _{OXA-51}	CC15	ST15 ST84	G5	
<i>bla</i> _{OXA-128}	CC10	ST82	NC	
<i>bla</i> _{OXA-86}	CC83	ST83	NC	
<i>bla</i> _{OXA-100}	CC32	ST32	NC	
<i>bla</i> _{OXA-65}	CC79	ST79	NC	

Legenda: IC, *international clone*; 3LST, trilocus sequencing typing; IP, Instituto Pasteur; CC, Complexo Clonal NC, não classificado

A comprovação da relação de clonalidade entre isolados clínicos de *Acinetobacter* ressalta a importância de programas de vigilância epidemiológica e de medidas para o controle de infecções em um hospital (Ghaith et al., 2017). Ainda, é possível traçar uma correlação entre o tipo de oxacilinase carregada entre determinados isolados, o ST ao qual pertencem e o impacto desse determinado perfil na mortalidade dos pacientes (Lee et al., 2015a)

Estudos moleculares e longitudinais, tais como o presente, permitem o conhecimento da epidemiologia e poderão fornecer subsídios para que se tomem medidas a fim de reduzir a disseminação de um determinado agente infeccioso. Em um contexto bem definido, como um hospital, poderão auxiliar a entender a dinâmica de transmissão de um patógeno de grande importância médica e ainda contribuir para a implementação de medidas capazes de

reduzir ou eliminar sua disseminação. Essas medidas implicarão, em última instância, na melhoria da segurança do paciente e na redução de efeitos adversos devido a infecções bacterianas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a diversidade genética e o perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas multirresistentes do Complexo *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* circulantes em um hospital de ensino no período de 2007 a 2014.

2.2 Objetivos Específicos

Em cepas de *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* isoladas de amostras de pacientes com bacteremias, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB), São Paulo, SP, Brasil, no período de 2007 a 2014, avaliar:

- as espécies dentro do Complexo ACB;
- a frequência das enzimas do tipo oxacilinases;
- a associação das oxacilinases à sequência *ISAbal1*;
- a atividade de fármacos antimicrobianos selecionados (tetraciclina, ampicilina-sulbactam, minociclina e polimixina B).
- a diversidade genética das cepas circulantes;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional, sem intervenção, realizado com 134 cepas bacterianas isoladas de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) e armazenadas na coleção de culturas do hospital entre 2007 e 2014. Este período foi escolhido, pois, em 2007 um novo fenótipo de resistência em *Acinetobacter* foi observado (sensibilidade somente a polimixina B, gentamicina e tobramicina), o qual tornou-se prevalente na instituição. Por tratar-se de um estudo retrospectivo, observacional, sem intervenção e com utilização de cepas armazenadas, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) não foi aplicado. O estudo foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz sob número de parecer CAAE 49985115.5.0000.0059.

O HC-FMB dispõe-se de 415 leitos regulares e 52 leitos de UTI (30 UTI-adulto, 15 UTI-neonatal e 07 UTI pediátrica), além de 194 consultórios médicos e 31 salas especializadas, assumindo o posto de maior instituição pública vinculada ao Sistema Único de Saúde (SUS) na região. A abrangência populacional do atendimento do Hospital é calculada em cerca de 1,5 milhão de usuários oriundos de 68 municípios do Departamento Regional de Saúde (DRS) VI – Bauru, além de pacientes de demais municípios brasileiros.

A instituição conta com uma Comissão de Controle de Infecção Relacionada à Assistência a Saúde (CCIRAS) desde 1973, embora sua denominação tenha mudado ao longo dos anos. Tal comissão é constituída nos termos da Lei 9.431 de 1997 e Portaria do Ministério da Saúde 2.616 de 1998 e efetua inúmeras práticas de vigilância epidemiológica junto ao Laboratório de Microbiologia do HC-FMB.

O Hospital vale-se do Prontuário Eletrônico do Paciente (PEP) desde 2013, o qual, além de integrar todos os processos hospitalares e facilitar o fluxo de dados, também informatizou todos os exames, prescrições e evoluções dos pacientes.

3.2 Seleção da amostra

Foram analisadas amostras identificadas como pertencentes ao Complexo ACB isoladas de sangue (em alguns casos ponta de cateter), com perfil de multirresistência previamente determinado pelo laboratório vinculado ao HC-FMB e disponibilizado pelo hospital (resistência aos carbapenêmicos e a pelo menos outras duas categorias de drogas entre cefalosporinas, quinolonas, aminoglicosídeos, sulfas, tetraciclinas) de pacientes não repetidos e atendidos no HC-FMB entre 2007 e 2014.

Os dados relativos ao total de hemoculturas e à proporção de resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* no período foram provenientes do sistema informatizado do Hospital, disponibilizado pelo Centro de Informática Médica (CIMED).

3.3 Identificação fenotípica

As amostras foram inicialmente isoladas de sangue e cateter de pacientes com bacteremias por meio de método automatizado BACTEC e rolamento da ponta do cateter em placas contendo ágar sangue de carneiro a 5%, e identificadas fenotipicamente por metodologias clássicas: aspecto morfotintorial microscópico pela coloração de Gram, oxidação da glicose, ausência de citocromo oxidase e de motilidade e capacidade de crescer a 44°C (Schreckenberger e von Graevenitz 1999) e/ou em equipamento automatizado Vitek (BioMérieux). Os isolados foram armazenados em caldo nutriente com glicerol a 15%, a -70°C e reativadas em por crescimento em placa de *tryptic soy agar* (TSA) para este estudo.

3.4 Extração do DNA bacteriano

O material genético bacteriano foi extraído empregando-se a técnica de lise térmica. Foram dissolvidas de três a quatro colônias bacterianas em um

microtubo estéril contendo 1 ml de água ultrapura estéril. Essa suspensão foi aquecida a 95°C por 10 minutos e, em seguida, centrifugada a 12000 rpm, a 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo estéril para estocagem a -20°C.

3.5 Identificação das espécies de *Acinetobacter* por PCR, e sequenciamento da região ITS e dos genes *rpoB* e 16S rRNA

Inicialmente todas as amostras foram submetidas à pesquisa do gene *gltA* utilizando iniciadores específicos (Wong, Chua e Thong, 2014) e à detecção do gene *bla*_{OXA-51-like} (item 3.5) para identificação de *A. baumannii*. Amostras que apresentaram resultado negativo para ambos os genes foram submetidas ao sequenciamento do espaçador intergênico das subunidades 16S-23S do rRNA (região ITS) (Chang et al., 2005), do gene da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) (La Scola et al., 2006) e do gene 16S rRNA (Weisburg et al. 1991) para a identificação das espécies de *Acinetobacter*. Adicionalmente, uma parcela (n=27) das amostras identificadas como *A. baumannii* foi escolhida aleatoriamente a fim de também ser identificada por sequenciamento gênico.

Os iniciadores e as condições de amplificação de ciclagem do termociclador, assim como o tamanho do produto amplificado, estão discriminados no Quadro IV.

Quadro IV- *Primers, tamanho do produto esperado e condições de amplificação para a região ITS, 16S rRNA e dos genes rpoB e gltA do Complexo Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii*

Alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Condições de amplificação	Referência
Região ITS	1512F	GTCGTAACAAGGTAGCCGTA	1385 pb	1 ciclo 94°C/2' 35 ciclos 94°C/1' 62°C/1' 72°C /1' 1 ciclo 72°C/7'	Cheng et al., 2005
	6R	GGGTTYCCCCRTTCRGAAAT			
<i>rpoB</i>	Ac696F	TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG	857pb	1 ciclo 95°C/2' 35 ciclos 94°C/30" 55°C/30" 72°C /2' 1 ciclo 72°C/10'	La Scola et al., 2006
	Ac1055F	GTGATAARATGGCBGGTCGT			
	Ac1598R	CGBGCRTGCATYTTGTCRT			
<i>gltA</i>	F1	GTGGCACATTAGGTCCCGA	189 pb	1 ciclo 95°C/5' 25 ciclos 95°C/1' 50°C/30" 72°C /1' 1 ciclo 72°C/5'	Wong et al., 2014
	F2	CAAGGTAGTCTGCTTGAGTCG			
16S	fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	857pb	1 ciclo 95°C/2' 35 ciclos 94°C/30" 55°C/30" 72°C /2' 1 ciclo 72°C/10'	Weisburg et al., 1991
	rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC			

A amplificação de cada gene de interesse foi feita por PCR em microtubos com volume final de 20µL contendo 8,2 µL de água ultra pura, 0,4 µL de cada *primer* na concentração de 10 µM (concentração final de 0,2 µM), 10 µL de Mix 2x adicionado de 1 µL de DNA. Os iniciadores e as condições de amplificação estão apresentados no Quadro IV. Os microtubos foram incubados em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) seguindo as condições de corrida específicas para cada gene. Os produtos amplificados

foram aplicados em gel de agarose a 1,0% e a eletroforese foi realizada a 90 V, por 40 minutos. O gel foi corado por brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador de géis (Bio-Imaging Systems) sob luz ultravioleta.

Este produto de PCR amplificado foi purificado com ExoSAP-IT (Affymetrix) (5 μ L de DNA amplificado + 1 μ L de ExoSAP-IT) e incubado em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) por 15 minutos a 37°C para ativação das enzimas, seguido por mais 15 minutos a 80°C para inativação das enzimas, mantendo-se o produto a 4°C até o momento de uso.

A partir do produto amplificado purificado, foi feita uma reação de PCR utilizando nucleotídeos ddNTP marcados com fluoróforos (marcação com Big Dye®, Applied Biosystems). Tal reação foi preparada contendo 0,875 μ L de água ultra pura, 0,875 μ L de buffer 10x para Big Dye®, 0,25 μ L de Big Dye® e 2 μ L de *primer* apenas *forward* ou apenas *reverse* à concentração de 0,67 μ M. Essa etapa foi realizada ao abrigo da luz em placa de 96 cavidades, cada uma delas contendo 4 μ L de reação e adicionadas de 1 μ L do DNA amplificado previamente purificado. A placa foi incubada em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) nas seguintes condições: 10 minutos a 96°C e 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C, com variação de 1°C/segundo em cada uma das etapas. Ao fim da incubação, a placa contendo os produtos amplificados marcados foi submetida à purificação do excesso de ddNTP, utilizando-se o protocolo de etanol-acetato.

Para a purificação pelo protocolo de etanol-acetato, foram adicionados 15 μ L de água ultra pura em cada cavidade contendo o produto da reação com Big Dye®, seguido de 80 μ L de solução NaOAc/95%. A placa permaneceu em temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, foi centrifugada por 45 minutos a 4°C e 2000 x g. Terminada a centrifugação, verteu-se o conteúdo da placa em papel absorvente. A placa foi então invertida e submetida a nova centrifugação por 1 minuto a 500 x g para retirada do excesso de reagente. Adicionou-se então 150 μ L de etanol 70% a 4°C em cada cavidade da placa, centrifugando-a por 10 minutos a 4°C e 2000 x g. Após essa etapa, o conteúdo da placa foi novamente vertido em papel absorvente e realizou-se nova centrifugação com a placa invertida, por 1 minuto a 500 x g para retirada do

excesso de etanol. A placa foi então armazenada ao abrigo da luz a -20°C até o momento do sequenciamento. O produto precipitado foi ressuspenso utilizando formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e as reações de sequenciamento foram realizadas pelo método de Sanger em equipamento Sequenciador Automático Applied 3730. As sequências *sense* e *antisense* de cada um dos alelos foram utilizadas para formação do *contig*, o qual foi submetido à análise utilizando-se o software BioNumerics 7.6 (Applied Maths).

3.6 Detecção dos genes *bla_{OXA}* e *ISAba1*

Os genes das principais oxacilinases (OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-143-like) foram pesquisados por PCR multiplex (Higgins, Lehmann e Seifert 2010; Woodford et al. 2006), que foi realizada em microtubo com volume final de 20 µL contendo 8,2 µL de água ultra pura, 0,4 µL de cada *primer forward* e *reverse* na concentração de 10 µM (concentração final de 0,2 µM), 10 µL de Mix 2x adicionado de 1 µL de DNA. Os iniciadores e as condições de amplificação de ciclagem do termociclador, assim como o tamanho do produto amplificado, estão discriminados no Quadro V. Os microtubos foram colocados em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) seguindo as condições de corrida específicas para cada gene. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,0% e a eletroforese foi realizada a 90 V, por 40 minutos. O gel foi corado por brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador de géis (Bio-Imaging Systems) sob luz ultravioleta para documentação e análise. Amostras já caracterizadas como carreadoras dos genes de interesse foram incluídas como controles positivos das reações (Camargo et al., 2016).

Para a detecção do elemento *ISAba1* a montante dos genes *bla_{OXA}*, foi utilizado o protocolo proposto por Turton e colaboradores (2006). Para cada amostra, em um microtubo de volume final 20 µL, foi 8,2 µL de água ultra pura, 10 µL de Mix 2x, 0,4 µL do primer *ISAba1F* (concentração inicial 10 µM e final 0,2 µM), 0,4 µL do primer *OXA51 R* ou *OXA23 R* (concentração inicial 10 µM e

final 0,2 μ M) e 1 μ l de DNA. Os iniciadores e as condições de amplificação de ciclagem do termociclador, assim como o tamanho do produto amplificado, estão discriminados no Quadro V. Os microtubos foram incubados em termociclador seguindo as condições de corrida específicas para cada gene. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,0% e a eletroforese foi realizada a 90 V, por 40 minutos. O gel foi corado por brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador de géis (Bio-Imaging Systems) sob luz ultravioleta.

Quadro V-. Primers, tamanho do produto esperado e condições de amplificação para detecção dos genes *bla_{OXA}* e *IS_{Aba1}* em espécies do Complexo *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii*

Gene alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Condições de amplificação	Referência
<i>bla</i> OXA-23-like	OXA-23F	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	501	1 ciclo 94°C/5' 30 ciclos 94°C/30'' 52°C/40'' 72°C/50'' 1 ciclo 72°C/6'	Higgins, Lehmann e Seifert 2010; Woodford et al., 2006
	OXA-23R	ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT			
<i>bla</i> OXA-51-like	OXA-51F	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353		
	OXA-51R	GG ATT GCA CTT CAT CTT GG			
<i>bla</i> OXA-58-like	OXA-58F	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	599		
	OXA-58R	CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC			
<i>bla</i> OXA-24-like	OXA-24F	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	246		
	OXA-24R	AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT			
<i>bla</i> OXA-143-like	OXA-143F	TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT	149		
	OXA-143R	TAA TCT TGA GGG GGC CAA CC			
<i>IS</i> <i>Aba1</i>	IS <i>Aba1</i> F	CAC GAA TGC AGA AGT TG	549	1 ciclo 95°C/5' 35 ciclos 95°C/45'' 56°C/45'' 72°C/3' 1 ciclo 72°C/5'	Turton et al., 2006
	IS <i>Aba1</i> R	CGA CGA ATA CTA TGA CAC			

3.7 Sequenciamento das variantes de OXA-51-like, OXA-24-like e OXA-143-like

Foi realizado o sequenciamento das oxacilinasas OXA-51-like segundo Hérítier e colaboradores (2005), OXA-24-like e OXA-143-like para a determinação de suas variantes conforme o protocolo de Cayô e colaboradores (2014) e Higgins e colaboradores (2009), respectivamente.

A amplificação de cada gene de interesse foi feita via PCR em microtubos com volume final de 20 μL contendo 8,2 μL de água ultra pura, 0,4 μL de cada *primer forward* e *reverse* na concentração de 10 μM (concentração final de 0,2 μM), 10 μL de Mix 2x adicionado de 1 μL de DNA. Os iniciadores e as condições de amplificação estão apresentados no Quadro VI. Os microtubos foram incubados em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) seguindo as condições de corrida específicas para cada gene. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,0% e a eletroforese foi realizada a 90 V, por 40 minutos. O gel foi corado por brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador de géis (Bio-Imaging Systems) sob luz ultravioleta.

Este produto de PCR amplificado foi purificado com enzima ExoSAP-IT (Affymetrix) (5 μL de DNA amplificado + 1 μL de ExoSAP-IT) e incubado em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) por 15 minutos a 37°C para ativação das enzimas, seguido por mais 15 minutos a 80°C para inativação das enzimas, mantendo-se o produto a 4°C até o momento de uso.

A partir do produto amplificado purificado, foi feita uma reação de PCR utilizando nucleotídeos ddNTP marcados com fluoróforos (marcação com Big Dye®, Applied Biosystems). Tal reação foi preparada contendo 0,875 μL de água ultra pura, 0,875 μL de buffer 10x para Big Dye®, 0,25 μL de Big Dye® e 2 μL de *primer* apenas *forward* ou apenas *reverse* à concentração de 0,67 μM . Essa etapa foi realizada ao abrigo da luz em placa de 96 cavidades e adicionada de 1 μL de DNA previamente purificado. A placa foi incubada em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) nas seguintes condições: 10 minutos a 96°C e 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C, com variação de 1°C/segundo em cada uma das etapas e posteriormente submetida à purificação do excesso de ddNTP, utilizando-se o protocolo de etanol-acetato.

Em cada cavidade contendo o produto da reação com Big Dye® foram adicionados 15 μL de água ultra pura, seguido de 80 μL de solução NaOAc/ 95%. A placa permaneceu em temperatura ambiente por 15 min e, em seguida, foi centrifugada por 45 minutos a 4°C e 2000 x g. Terminada a centrifugação, verteu-se o conteúdo da placa em papel absorvente. A placa foi então invertida

e submetida a nova centrifugação por 1 minuto a 500 x *g* para retirada do excesso de reagente. Adicionou-se então 150 µL de etanol 70% gelado em cada cavidade da placa, centrifugando-a por 10 minutos a 4°C e 2000 x *g*. Após essa etapa, o conteúdo da placa foi novamente vertido em papel absorvente e realizou-se nova centrifugação com a placa invertida, por 1 minuto a 500 x *g* para retirada do excesso de etanol. A placa foi então armazenada ao abrigo da luz a -20°C até o momento do sequenciamento. O produto precipitado foi ressuspenso utilizando formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e as reações de sequenciamento foram realizadas pelo método de Sanger em equipamento Sequenciador Automático Applied 3730. As sequências *sense* e *antisense* de cada um dos alelos foram utilizadas para formação do *contig*, o qual foi comparado com as sequências depositadas no banco de dados GenBank (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>).

Quadro VI- *Primers, tamanho do produto esperado e condições de amplificação para amplificação dos genes codificadores de OXA-51-like, OXA-143-like e OXA-24/40-like pré-sequenciamento em espécies do Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii**

Gene alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Condições de amplificação	Referência
OXA-51-like	OXA-69F	CTAATAATTGATC TACTCAAG	975	1 ciclo 94°C/5' 30 ciclos 94°C/30'' 52°C/40'' 72°C/50'' 1 ciclo 72°C/6'	Héritier et al., 2005
	OXA-69R	CCAGTGGATGGAT GGATAGATTAT			
OXA-143-like	Pré-OXA-143F	AGTTAACTTTCAA TAATTG	825	1 ciclo 95°C/2' 30 ciclos 95°C/1' 51°C/1' 72°C/1' 1 ciclo 72°C/7'	Higgings et al., 2009
	Pré-OXA-143R	TTGGAAAATTATA TAATCCC			
OXA-24/40-like	Pré-OXA-24/40F	AYTTCGBATAAYS SCCATTATGTTAA ATTAAAAGA	1000	1 ciclo 95°C/5' 35 ciclos 95°C/30'' 45°C/30'' 72°C/1' 1 ciclo 72°C/7'	Cayô et al., 2014
	Pré-OXA-24/40R	ATTTTCGYATAASG YGTATTATGTTAAT TTTAGAAA			

3.8 Detecção dos genes de outras carbapenemases

Realizou-se a pesquisa das carbapenemases SPM, IPM, VIM, NDM, KPC, OXA-48 para as amostras de *A. baumannii* (n=114) pela técnica de PCR multiplex (Poirel et al., 2011). As amostras foram distribuídas em 22 *pools* de cinco amostras e um *pool* comorto por quatro amostras, Os iniciadores e as condições de amplificação estão apresentados no Quadro VII.

Quadro VII- Primers, tamanho do produto esperado e condições de amplificação para amplificação dos genes codificadores das carbapenemases SPM, IMP, VIM, NDM, KPC, OXA-48

Gene alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Condições de amplificação	Referência
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-F	GGAATAGAGT GGCTTAAYTCTC	232	1 ciclo 94°C/10' 35 ciclos 94°C/30'' 52°C/40'' 72°C/50'' 1 ciclo 72°C/5'	Poirel et al., 2011
	IMP-R	GGTTTAAYAA AACAACCACC			
<i>bla_{SPM}</i>	SPM-F	AAAATCTGGG TACGCAAACG	271		
	SPM-R	ACATTATCCG CTGGAACAGG			
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F	GATGGTGTTT GGTCGCATA	390		
	VIM-R	CGAATGCGC AGCACCAG			
<i>bla_{OXA-48}</i>	OXA-F	GCGTGGTTAA GGATGAACAC	438		
	OXA-R	CATCAAGTTC AACCCAACCG			
<i>bla_{NDM}</i>	NDM-F	GGTTTGGCGA TCTGGTTTTTC	621		
	NDM-R	CGGAATGGCT CATCACGATC			
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-Fm	CGTCTAGTTC TGCTGTCTTG	798		
	KPC-Rm	CTTGTCATCC TTGTTAGGCG	232		

3.9 Determinação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana

3.9.1 Determinação do perfil de susceptibilidade por disco-difusão

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana foi determinado para os fármacos amicacina (AK), cefepime (FEP), ceftazidima (CAZ), cefotaxime (CTX), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GN), levofloxacina (LEV), piperacilina-tazobactam (PTZ), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), ticarcilina-ácido clavulânico (TIM) e tobramicina (TOB) via disco-difusão.

Preparou-se para cada amostra uma suspensão bacteriana (de crescimento recente) ajustada a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia) em solução de NaCl 0,85% estéril. A suspensão bacteriana foi semeada em três direções diferentes na superfície de placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (Oxoid) por meio de um swab estéril. Após a absorção do excesso de líquido pelo ágar, foram aplicados os discos de papel impregnados de antibiótico (Oxoid) com auxílio de uma pinça, de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16-20 horas. A leitura dos resultados foi feita medindo-se o diâmetro do halo de inibição formado. As amostras foram categorizadas em sensível, intermediária e resistente de acordo com os pontos de corte estabelecidos (CLSI 2017). Para validação do teste, cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) foram avaliadas simultaneamente.

As amostras foram classificadas em multirresistentes (MDR) ou extensivamente resistente (XDR) segundo o critério definido por Magiorakos e colaboradores (2012).

3.9.2 Determinação da do perfil de susceptibilidade por concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada para os antimicrobianos tetraciclina (TE), ampicilina-sulbactam (SAM) e minociclina (MIN) pela técnica de microdiluição em caldo e para polimixina B (PB), tigeciclina (TG), meropenem (MEM) e imipenem (IMP) por meio da técnica de E-test®, conforme recomendações do CLSI (CLSI 2017) e do fabricante, respectivamente. Os pontos de corte para determinação da sensibilidade à tigeciclina foi definida segundo os pontos de corte estabelecidos pelo US Food and Drug Administration. Para realização da técnica de microdiluição em caldo, 50 µl de Caldo Mueller Hinton cátion-ajustado (CMHCA, Becton, Dickinson and Company) foram aliquotados em cada cavidade de placas de 96 cavidades em fundo em U nas colunas 1 a 11. A seguir, foi preparada uma solução com concentração 64 µg/ml do fármaco a ser testado (Sigma-Aldrich) em CMHCA e distribuiu-se 100 µl dessa solução homogeneizada nas oito cavidades da coluna 12 da placa. Transferiu-se com micropipeta automática multicanal 50 µl do conteúdo da coluna 12 para a coluna 11, e assim sucessivamente até a coluna 3, homogeneizando sempre, a fim de se obter uma placa com diluição seriada (1:2) do fármaco. Os 50 µl excedentes da coluna 3 foram descartados, a fim de que a coluna 1 e 2 contivessem apenas CMHCA. Em seguida, preparou-se uma suspensão bacteriana de crescimento recente ajustada a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mL) em solução de NaCl 0,85% estéril para cada amostra. Diluiu-se essa suspensão em um tubo contendo CMHCA, a fim de se obter uma solução diluída 1:150. Na sequência, inoculou-se 50 µl dessa solução em cada uma das cavidades das colunas 3 a 12 para o teste de sensibilidade e também na coluna 2, para controle de crescimento bacteriano. A coluna 1 manteve-se contendo exclusivamente 50 µl de CMHCA para controle de esterilidade do teste. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16-20 horas. Após esse período os resultados foram lidos verificando-se qual concentração mínima de cada antimicrobiano suficiente para inibir o crescimento de cada uma das cepas. Isto

é, qual a primeira cavidade límpida (sem turvação ou presença de botão indicativo de crescimento bacteriano) na série de diluições da droga para cada cepa. Para a técnica de E-test® preparou-se para cada amostra uma suspensão bacteriana (de crescimento recente) ajustada a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia) em solução de NaCl 0,85% estéril. A suspensão bacteriana foi semeada em três direções diferentes na superfície de placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (Oxoid) por meio de um *swab* estéril. Após a absorção do excesso de líquido pelo ágar, foram aplicadas as tiras de E-test® (BioMerieux) com auxílio de uma pinça, de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16-20 horas. A leitura dos resultados foi feita aferindo-se o ponto de intersecção entre elipse formada e a fita de E-test®. As amostras foram categorizadas em susceptível, intermediária e resistente de acordo com os pontos de corte estabelecidos (CLSI 2017). Para validação do teste, cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) foram avaliadas simultaneamente. Os valores da concentração inibitória mínima capazes de inibir o crescimento de 50 e 90% dos isolados (CIM₅₀ e CIM₉₀) também foram calculados.

3.10 Avaliação da diversidade genética

3.10.1 Determinação do padrão eletroforético por PFGE

Para determinação da diversidade genética entre os isolados, a técnica de eletroforese em campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis*, PFGE) foi empregada, conforme protocolo padronizado por Seifert e colaboradores (2005). Inicialmente, preparou-se uma suspensão bacteriana (de crescimento de 18-20h) ajustada a aproximadamente 10^9 células/mL em Tampão de Suspensão Celular (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8,0); a seguir, uma alíquota de 200 µL desta suspensão foi transferida para microtubo de

centrífuga de 1,5 mL e incubada a 55°C por 10 minutos. Foi acrescentada a este tubo 10 µL de proteinase K (Bioline solução 20 mg/ml), 5 µL de lisozima (Promega) solução 40 mg/ml e 200 µL de agarose (SeaKem Gold Agarose, Lonza) específica para preparo de plugues para PFGE, fundida e estabilizada a 50°C, à concentração de 1,0% em tampão TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0). A suspensão de células em agarose foi então distribuída nos moldes para *plugs*, deixados à temperatura ambiente por 5 minutos e em geladeira por mais 5 minutos para completa solidificação. Em seguida, os plugues foram transferidos para tubos contendo 5 mL de tampão de lise celular (50 mM Tris, 50 mM EDTA [pH 8;0], 1% sarcosil) com 25 µL de proteinase K (solução 20 mg/mL) e incubados a 55°C por 2 horas sob agitação constante (120 rpm). Após a lise, o tampão foi removido e os plugues lavados seis vezes, por 15 minutos cada lavagem, sendo duas vezes com água ultrapura estéril e quatro vezes com tampão TE, sob incubação de 50°C e agitação constante. Na sequência, os plugues foram cortados, com largura aproximada de 2 mm, e submetidos à digestão com 30 U da enzima Apal (Promega), de acordo com o tempo de incubação e temperatura recomendados pelo fabricante (37°C/18-20h). Os plugues com DNA digerido foram então aplicados em um gel de agarose específica para PFGE (SeaKem Gold Agarose, Lonza) à concentração de 1%, em TBE 0,5X (40 mM Tris-HCl, pH 8,3; 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). A eletroforese foi efetuada no equipamento CHEF-DR-III (Bio-Rad), em tampão TBE 0,5X, e temperatura ajustada a 14°C. O tempo de eletroforese foi de 19h, com pulso inicial de 5 segundos e final de 20 segundos, e voltagem definida a 6 V/cm. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (Sigma) 1 µg/mL, por 30 minutos e descorado em água destilada em 3 lavagens de 15 minutos cada. Imagens dos géis foram capturadas sob iluminação ultravioleta em fotodocumentador de géis (Bio-Imaging Systems) e as fotos foram submetidas à análise pelo software BioNumerics 7.6 (Applied Maths).

A análise da relação genética entre os perfis eletroforéticos foi realizada utilizando-se o método UPGMA (*unweighted pair group method with mathematical averaging*) com o coeficiente de Dice com otimização e tolerância

definidas a 1,5% (Seifert et al., 2005); para normalização dos géis, foi utilizada a cepa de *Salmonella* Braenderup H9812 digerida pela enzima XbaI (30U, Promega) em pelo menos três linhas de cada gel. Os pulsotipos foram definidos como cada padrão eletroforético com 100% de similaridade (nomeados com letra maiúscula e número, de A1 a K4) enquanto os clusters foram definidos como agrupamentos com 87% ou mais de similaridade e nomeados com letra maiúscula (de A a K).

3.10.2 Tipagem dos clones de *A. baumannii* por 3LST (Turton et al., 2007)

A classificação dos isolados em grupos clonais por 3LST foi realizada conforme protocolo preconizado por Turton e colaboradores (2007) (Quadro VIII). Esta técnica permite a elucidação dos principais grupos clonais circulantes por meio do emprego de reações de multiplex-PCR, que utilizam sequências específicas dos genes *ompA* (que codifica a porina da membrana externa A), *csuE* (envolvido na formação de biofilme) e *bla_{OXA-51-like}* (codificador da carbapenemase intrínseca de *A. baumannii*). Esta metodologia emprega duas reações multiplex (Grupo 1 e Grupo 2), que foram realizadas em microtubos com volume final de 20 µL, contendo 0,4 µL de cada *primer* concentração de 10 µM (concentração final de 0,2 µM) (Quadro VIII), 10 µL de Mix 2x e 1 µL de DNA. Os microtubos foram incubados em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) seguindo as condições de corrida específicas para cada gene. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,0% e a eletroforese foi realizada a 90 V, por 40 minutos. O gel foi corado por brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador de géis (Bio-Imaging Systems) sob luz ultravioleta. Os iniciadores e as condições de amplificação estão apresentados no Quadro VIII. Para interpretação dos resultados, os isolados foram classificados como pertencentes aos grupos 1 a 14 de acordo com a proposta de Turton e colaboradores (2007) compilada por Karah e colaboradores (2012) (Quadro IX).

Quadro VIII- *Primers*, tamanho do produto esperado e condições de amplificação para determinação do grupo clonal de *Acinetobacter baumannii* por meio de duas reações de multiplex-PCR.

Primer		Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Condições de amplificação	Referência
Reação Grupo 1	Group1ompAF306	GAT GGC GTA AAT CG TGG TA	355	1 ciclo 94°C/3' 30 ciclos 94°C/45'' 57°C/45'' 72°C/1' 1 ciclo 72°C/5'	Turton et al., 2007
	Group1and2 ompAR660	CAA CTT TAG CGA TTT CTG G			
	Group1csuEF	CTT TAG CAA ACA TGA CCT ACC	702		
	Group1csuER	TAC ACC CGG GTT AAT CGT			
	Gp1OXA66F89	GCG CTT CAA AAT CTG ATG TA	559		
	Gp1OXA66R647	GCG TAT ATT TTG TTT CCA TTC			
Reação Grupo 2	Group2ompAF378	GAC CTT TCT TAT CAC AAC GA	343		
	Group1and2 ompAR660	CAA CTT TAG CGA TTT CTG G			
	Group2csuEF	GGC GAA CAT GAC CTA TTT	580		
	Group2csuER	CTT CAT GGC TCG TTG GTT			
	Gp2OXA69F169	CAT CAA GGT CAA ACT CAA	162		
	Gp2OXA69R330	TAG CCT TTT TTC CCC ATC			

Quadro IX- Interpretação dos resultados das reações de multiplex-PCR para determinação do grupo clonal de *Acinetobacter baumannii* (Karah et al., 2012).

Grupo Clonal	Reação Grupo 1			Reação Grupo 2			Referência
	<i>csuE</i> (702 bp)	<i>bla_{OXA-51}</i> (559 bp)	<i>ompA</i> (355 bp)	<i>csuE</i> (580 bp)	<i>ompA</i> (343 bp)	<i>bla_{OXA-51}</i> (162 bp)	
G1 (IC2)	+	+	+	-	-	-	Karah et al., 2012
G2 (IC1)	-	-	-	+	+	+	
G3 (IC3)	+	+	-	-	+	-	
G4	-	+	+	-	-	-	
G5	-	-	+	-	-	-	
G6	+	-	-	-	+	+	
G7	-	-	+	+	-	-	
G8	-	+	+	+	-	-	
G9	-	-	+	+	-	+	
G10	-	+	-	+	+	-	
G11	-	-	-	-	+	+	
G12	-	+	-	-	-	-	
G13	+	-	+	-	-	-	
G14	+	+	-	-	-	-	

Legenda: IC1, International Clone 1; IC2, International Clone 2; IC3, International Clone 3

3.10.3 Tipagem dos clones de *A. baumannii* por m3LST (Martins et al., 2016)

Foi realizada a tipagem dos isolados conforme protocolo preconizado por Martins e colaboradores (2016) (Quadro X). Esta metodologia emprega duas reações multiplex (SG1 e SG2) que foram realizadas em microtubos com volume final de 20µL, contendo 0,4 µL cada *primer* a concentração de 10 µM (concentração final de 0,2 µM) (Quadro X), 10 µL de Mix 2x e 1,0 µL de DNA. Os iniciadores e as condições de amplificação estão apresentados no Quadro V. Os microtubos foram incubados em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) seguindo as condições de corrida específicas para cada gene. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,0% e a eletroforese foi realizada a 90 V, por 40 minutos. O gel foi corado por brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador de géis (Bio-Imaging Systems) sob luz ultravioleta. Para interpretação dos resultados, as amostras foram classificadas como pertencentes aos grupos CC109/1, CC118/2, CC113/79, CC103/15 e CC110/25 (Quadro XI). Cepas previamente caracterizadas como pertencentes a estes CC foram incluídas como controle (Camargo et al., 2016).

Quadro X- Primers, tamanho do produto esperado e condições de amplificação para PCR multiplex método 3LTS para *A. baumannii* (Martins et al., 2016)

Gene	Primer	Sequência (5´-3´)	Produto (pb)	Condições de amplificação	Referência		
ompA	ompA-FM	TGGCGGTAAAGAT GGTAAC	327	1 ciclo 94°C/5´ 30 ciclos 94°C/1´ 53°C/1´ 72°C/2´ 1 ciclo 72°C/5´	Martins et al., 2016		
	ompA-RM	CCTAAAGTACCT TCTTCTGAGTTAC					
	ompA-RBM	TTCCAGAAC TCTCATCAGC	423				
csuE	csuE-FM	CGATTGTGGG AATCGGTGCC	239				
	csuE-FBM	TTGGCGAAC ATGACCTATT	531				
	csuE-RM	CACATAATATGG TGTATTTACCGAA	239				
blaOXA-51-like	OXA-51-FM	AGTATTTAAGT GGGACGGGC	114				
	OXA-51- RM	CGACGAGCTAAAT CTTGATAAACC					

Quadro XI- Interpretação dos resultados das reações de multiplex-PCR para determinação do grupo clonal de *Acinetobacter baumannii* (Martins et al., 2016).

Complexo Clonal (UO/IP)	<i>ompA</i>		<i>csuE</i>		<i>bla_{OXA-51-like}</i>
	327	423	239	531	114
109/1	-	-	+	+	-
118/2	-	+	-	-	-
103/15	-	+	-	-	+
113/79	+	+	-	-	-
110/25	-	-	+	-	+

Legenda: UO, Universidade de Oxford; IP, Instituto Pasteur

3.10.4 Análise por Multilocus Sequence Typing (MLST)

A ancestralidade e distribuição global dos pulsotipos foram determinadas por meio da análise de *multilocus sequence typing* (MLST) de sete genes constitutivos (*cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB* e *rpoB*), conforme padronização disponibilizada pelo Instituto Pasteur (Quadro XII).

Uma amostra representante de cada pulsotipo determinado por PFGE foi submetida à técnica de MLST a fim de se determinar o seu *sequence type* (ST). A amplificação de cada gene de interesse foi feita via PCR em microtubos com volume final de 20 µL contendo 8,2 µL de água ultra pura, 0,4 µL de cada *primer* na concentração de 10 µM (concentração final 0,2 µM), 10 µL de Mix 2x, adicionado de 1µL de DNA. Os iniciadores e as condições de amplificação estão apresentados no Quadro XII. Os microtubos foram incubados em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) seguindo as condições de corrida específicas para cada gene. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,0% e a eletroforese foi realizada a 90 V, por 40 minutos. O gel foi corado por brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador de géis (Bio-Imaging Systems) sob luz ultravioleta.

Este produto de PCR amplificado foi purificado com ExoSAP-IT (Affymetrix) (5 µL de DNA amplificado + 1 µL de ExoSAP-IT) e incubado em termociclador por 15 minutos a 37°C para ativação da enzima, seguido por mais 15 minutos a 80°C para inativação da enzima, mantendo-se o produto a 4°C até o momento de uso.

A partir do produto amplificado purificado, foi feita uma reação de PCR utilizando nucleotídeos ddNTP marcados com fluróforos marcação com Big Dye® (Applied Biosystems). Tal reação foi preparada contendo 0,875 µL de água ultra pura, 0,875 µL de buffer 10x para Big Dye®, 0,25 µL de Big Dye® e 2 µL de *primer* apenas *forward* ou apenas *reverse* à concentração de 0,67 µM, com adição de 1 µL de DNA previamente purificado. Essa etapa foi realizada ao abrigo da luz em placa de 96 cavidades, cada uma delas contendo 4 µL de reação. A placa em questão foi incubada em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) nas seguintes condições: 10 minutos a 96°C e 30 ciclos de 10

segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Ao fim da incubação, a placa contendo os produtos amplificados marcados foi submetida à purificação do excesso de ddNTP, utilizando-se o protocolo de etanol-acetato.

Para a purificação com etanol-acetato, foram adicionados 15 µL de água ultrapura em cada cavidade contendo o produto da reação com Big Dye®, seguido de 80 µL de solução NaOAc/ 95%. A placa permaneceu em temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, foi centrifugada por 45 minutos a 4°C e 2000 x g. Terminada a centrifugação, verteu-se o conteúdo da placa em papel absorvente. A placa foi então invertida e submetida a nova centrifugação por 1 minuto a 500 x g para retirada do excesso de reagente. Adicionou-se então 150 µL de etanol 70% gelado em cada cavidade da placa, centrifugando-a por 10 minutos a 4°C e 2000 x g. Após essa etapa, o conteúdo da placa foi novamente vertido em papel absorvente e realizou-se nova centrifugação com a placa invertida, por 1 minuto a 500 x g para retirada do excesso de etanol. A placa foi então armazenada ao abrigo da luz a -20°C até o momento do sequenciamento. O produto precipitado foi ressuspendido utilizando formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e as reações de sequenciamento foram realizadas pelo método de Sanger em equipamento Sequenciador Automático Applied 3730. As sequências *sense* e *antisense* de cada um dos alelos foram utilizadas para formação do *contig*, o qual foi submetido à análise comparativa com aquelas disponíveis no banco de dados disponibilizado pelo Instituto Pasteur (www.pasteur.fr/mlst), utilizando-se o software BioNumerics 7.6 (Applied Maths). De acordo com a combinação dos alelos dos sete genes, atribuiu-se um número de *sequence type* (ST) para cada amostra. A distribuição dos ST em complexos clonais foi determinada pelos métodos de eBurst (<http://eburst.mlst.net/>), para definição dos complexos clonais, adotando todo o banco disponível no site do MLST online, e a semelhança de seis alelos.

Quadro XII- Iniciadores, tamanho do produto esperado e condições de amplificação MLST segundo protocolo do Instituto Pasteur.

Alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Condições de amplificação	Referência
cpn60 Chaperonina 60-KDa	cpn60F	ACT GTA CTT GCT CAA GC	405	1 ciclo 94°C/2' 35 ciclos 94°C/30'' 50°C/30'' 72°C/30'' 1 ciclo 72°C/5'	Instituto Pasteur ¹
	cpn60R	TTC AGC GAT GAT AAG AAG TGG			
fusA proteína de elongação	FusaF	ATC GGT ATT TCT GCK CAC ATY GAT	633		
	FusaR	CCA ACA TAC KYT GWA CAC CTT TGT T			
glfA Citrato sintase	GltA F	AAT TTA CAG TGG CAC ATT AGG TCC C	483		
	GltA R	GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G			
pyrG CTP sintase	PyrGF	GGT GTT GTT TCA TCA CTA GGW AAA GG	297		
	PyrGR	ATA AAT GGT AAA GAY TCG ATR TCA CCM A			
recA fator de recombinação homólogo	RecAF	CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC	372		
	RecAR	GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC			
rpIB proteína L2 da porção ribossomal 50S	RplBF	GTA GAG CGT ATT GAA TAC GAT CCT AAC C	330		
	RplBR	CAC CAC CAC CRT GYG GGT GAT C			
rpoB subunidade B da RNA polimerase	RpoBF	GGC GAA ATG GC(AGT) GA(AG) AAC CA	456		
	RpoBR	GA(AG) TC(CT) TCG AAG TTG TAA CC			

¹ http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/primers_Abaumannii.html

4 RESULTADOS

Foram inicialmente identificados 134 isolados como pertencentes ao Complexo *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* (ACB), com resistência a múltiplos antimicrobianos e isolados de sangue (n=128) ou de cateter (n=5), de pacientes com bacteremias internados no HC-FMB entre os anos de 2007 e 2014 para compor a casuística deste estudo além de um isolado de secreção traqueal (n=1). A única amostra isolada de secreção traqueal foi incluída no estudo por ser inicialmente considerada como o caso índice do novo fenótipo de resistência estabelecido no hospital (sensibilidade apenas a gentamicina, tobramicina e polimixina B).

Entre 2007 e 2014, 280 hemoculturas foram positivas para *Acinetobacter* spp. resistentes a imipenem no HC-FMB, número que corresponde a 5,4% de todas as hemoculturas positivas do Hospital nesse período (n=11.092) (Figura 4)

Figura 4. Frequência de *Acinetobacter* spp. isolados de hemoculturas no período entre 2007 e 2014 no HC-FMB. As colunas indicam a % de culturas com crescimento de *Acinetobacter* (escala à esquerda) enquanto a linha indica o número de culturas positivas, por ano (escala à direita).

A análise dos dados demográficos mostrou que 2,2% dos isolados de *Acinetobacter* selecionadas para este estudo se concentrou no ano de 2007; 2008, 6,7% delas; em 2009 foram isoladas 7,4% das amostras, em 2010, 4,5%;

em 2011, 17,1%, em 2012 foram isoladas 8,9% das amostras; em 2013, 26,6% e o ano de 2014, 26,1% delas.

Em relação aos locais de atendimento, cinco grandes grupos foram estabelecidos: Ambulatório, que englobou as amostras isoladas de ambulatório e de uma transferência proveniente de outro hospital da cidade; Enfermarias, que reuniu as alas de cardiologia clínica e cirúrgica, cirurgia vascular, clínica médica, gastroenterologia clínica e cirúrgica, ginecologia, hematologia, moléstias infecciosas, nefrologia, neurologia, neurocirurgia, ortopedia, pediatria, pneumologia, pronto-socorro e urologia; UTI Adulto, dizendo respeito a UTI adulto, UTI pronto-socorro e UTI central; UTI Pediátrica, que englobou UTI pediátrica e UTI berçário e, por fim, NI (não informado), referente a isolados com informações não disponíveis (Tabela 1).

Tabela 1- Informações epidemiológicas referentes aos 134 isolados selecionados para o estudo

INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS	NÚMERO DE AMOSTRAS	%
Sítio de isolamento		
Sangue periférico	128	95,5
Ponta de catéter	5	3,7
Aspirado traqueal	1	0,7
Ano de isolamento		
2007	3	2,2
2008	9	6,7
2009	10	7,4
2010	6	4,5
2011	23	17,1
2012	12	8,9
2013	33	24,6
2014	35	26,1
Local de atendimento*		
Ambulatório	2	1,5
Enfermarias	75	55,9
UTI Adulto	44	32,8
UTI Pediátrica	6	4,5
NI	7	5,2

*agrupamento detalhado no texto

Tais isolados encontravam-se armazenados na bacterioteca do HC-FMB e foram reativados para o presente estudo. Deste total, quatro isolados (identificados como 17, 75, 76 e 112) não apresentaram crescimento em meios de enriquecimento, sendo então excluídos. Entre os 130 isolados restantes, outros três foram excluídos (identificados 69, 74, 108), devido a contaminação por outros organismos, mesmo após sucessivas tentativas de isolamento da cepa de *Acinetobacter*. Desta maneira, o número final de isolados fenotipicamente identificados como ACB foi de 127.

4.1 Identificação molecular

A pesquisa dos genes *gltA* e *bla*_{OXA-51-like} permitiu identificar 114 dos 127 isolados (89,8%) como *A. baumannii*. Os demais 13 (11,4%) isolados não apresentaram os genes específicos de *A. baumannii* e foram submetidos ao sequenciamento dos genes *rpoB* e/ou da região ITS e/ou do gene rRNA 16S para identificação. Destes, quatro isolados foram identificados como *A. nosocomialis*, dois como *A. pittii*, dois como *A. bereziniae*, um como *A. ursingii*, um como *A. variabilis* e um *A. gyllenbergii*, além de dois isolados identificados apenas como *Acinetobacter* spp. (Tabela 2)

Tabela 2- Frequência e metodologia da identificação das diferentes espécies de *Acinetobacter* (n=127)

Espécie	Frequência		Método de identificação
	N	%	
<i>A. baumannii</i>	114	89,8	PCR <i>bla</i> _{OXA-51-like} , PCR gene <i>gltA</i> , sequenciamento da região ITS (n= 27)
<i>A. nosocomialis</i>	4	3,1	Sequenciamento gene <i>rpoB</i> , região ITS
<i>A. pittii</i>	2	1,7	Sequenciamento gene <i>rpoB</i>
<i>A. bereziniae</i>	2	1,7	Sequenciamento gene <i>rpoB</i>
<i>A. uersingii</i>	1	0,9	Sequenciamento gene <i>rpoB</i>
<i>A. gyllenbergii</i>	1	0,9	Sequenciamento gene <i>rpoB</i> , gene 16S
<i>A. variabilis</i>	1	0,9	Sequenciamento gene <i>rpoB</i>
<i>Acinetobacter</i> spp.	2	1,7	Sequenciamento gene <i>rpoB</i>
Total	127	100	

Os resultados dos testes fenotípicos para espécies não-*baumannii* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Resultados das principais provas fenotípicas para identificação de *Acinetobacter* não-*baumannii*

Amostra	Identificação	Gram	Oxidase	Motilidade	Citrato de Simmons	Oxidação glicose	Crescimento em			
							MC	37°C	42°C	44°C
63	<i>A. nosocomialis</i>	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	+	-	+	+	+	-
73	<i>A. nosocomialis</i>	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	+	-	+	+	+	+
101	<i>A. nosocomialis</i>	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	+	-	+	+	+	+
118	<i>A. nosocomialis</i>	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	+	-	+	+	+	+
70	<i>A. pittii</i>	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	+	-	+	+	+	+
130	<i>A. pittii</i>	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	+	-	+	+	+	+
121	<i>A. variabilis</i>	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	-	-	+	+	+	+
65	<i>A. bereziniae</i>	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	+	-	+	-	-	-
98	<i>A. bereziniae</i>	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	+	-	+	+	+	-
71	<i>A. gyllenbergii</i>	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	+	-	+	+	+	+
85	<i>A. ursingii</i>	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	+	+	+	+	+	-
111	<i>Acinetobacter</i> spp.	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	+	-	+	+	+	+
126	<i>Acinetobacter</i> spp.	cocobacilos Gram-negativos agrupados aos pares	-	-	+	-	+	+	+	+

Legenda: MC, crescimento em Ágar MacConkey

4.2 Detecção das oxacilinases e Pesquisa de IS*Aba1*

Deu-se seguimento aos testes com os 114 isolados de *A. baumannii* (todos carreadores de *bla*OXA-51-like) (Tabela 4). Nestes, foi identificado o gene de *bla*OXA-23-like em 105 isolados (92,1%), *bla*OXA-143-like em dois isolados (1,7%) e de *bla*OXA-24-like em um isolado (0,8%). O gene *bla*OXA-58-like não foi detectado em nossa amostragem. Não houve caso da presença de *bla*OXA-23-like, *bla*OXA-24-like e *bla*OXA-143-like associados uns aos outros, nem da produção de três ou mais tipos de *bla*OXA em um mesmo isolado. Entretanto, seis isolados (5,3%) carregaram exclusivamente *bla*OXA-51-like (Tabela 4).

Tabela 4- Distribuição e associações dos genes das oxacilinases encontrados entre os isolados (n=114)

Associações entre oxacilinases	Frequência	
	N	%
OXA-51-like	6	5,3
OXA-51-like+OXA-24/40-like	1	0,9
OXA-51-like+OXA-143-like	2	1,7
OXA-51-like+OXA-23-like	105	92,1
Total	114	100

O elemento IS*Aba1* foi pesquisado à jusante e à montante dos genes *bla*OXA-51-like, *bla*OXA-23-like, *bla*OXA-24-like e *bla*OXA-143-like. IS*Aba1* foi identificado a montante de *bla*OXA-51-like em 31 (27,2%) isolados, associado ou não à sua ocorrência à jusante (Tabela 5).

Tabela 5- Associação do elemento de inserção *ISAb₁* a jusante e a montante dos genes *bla_{OXA-51-like}* em isolados do Complexo ACB isoladas de pacientes com bacteremias atendidos pelo HC-FMB entre 2007 e 2014 (n=114)

Combinação			Frequência	
			N	%
<i>ISAb₁</i> a montante	<i>bla_{OXA-51-like}</i>	<i>ISAb₁</i> a jusante	4	3,5
–	<i>bla_{OXA-51-like}</i>	<i>ISAb₁</i> a jusante	35	30,7
<i>ISAb₁</i> a montante	<i>bla_{OXA-51-like}</i>	–	27	23,7
–	<i>bla_{OXA-51-like}</i>	–	48	42,1
Total			114	100

Todos os 105 isolados carreadores do gene *bla_{OXA-23-like}* apresentaram associação com *ISAb₁*. O elemento *ISAb₁* foi encontrado exclusivamente à montante do gene em 87 isolados (82,8%) e simultaneamente à montante e à jusante em 18 (17,2%) (Tabela 6).

Tabela 6- Associação do elemento de inserção *ISAb₁* à jusante e à montante dos genes *bla_{OXA-23-like}* em isolados do Complexo ACB isoladas de pacientes com bacteremias atendidos pelo HC-FMB entre 2007 e 2014 (n=105)

Combinação			Frequência	
			N	%
<i>ISAb₁</i> a montante	<i>OXA-23-like</i>	<i>ISAb₁</i> a jusante	18	17,2
<i>ISAb₁</i> a montante	<i>OXA-23-like</i>	–	87	82,8
Total			105	100

Conforme esperado, o elemento de inserção *ISAb₁* não foi encontrado associado aos genes *bla_{OXA-24-like}* e *bla_{OXA-143-like}*, embora nos dois isolados carreadores de *bla_{OXA-143-like}* o elemento *ISAb₁* tenha sido encontrado a montante de *bla_{OXA-51-like}*.

4.3 Sequenciamento das oxacilinasas

A partir de seleção baseada de acordo com o perfil de PFGE, 31 isolados foram submetidos ao sequenciamento do alelo codificador da enzima OXA-51-like. As variantes identificadas foram OXA-88 (n=12), OXA-65 (n=5), OXA-69 (n=11), OXA-90 (n=1), OXA-78 (n=1) e OXA-70 (n=1). Oito isolados carreadores de OXA-88 (66,7%) e o isolado carreador de OXA-70 apresentaram mutações silenciosas.

O sequenciamento do gene *bla*_{OXA-143-like} definiu-o como *bla*_{OXA-231}, com 100% de similaridade à sequência JQ676953. Já a amostra carreadora do gene *bla*_{OXA-24/40-like} teve o alelo identificado como *bla*_{OXA-72}, idêntico ao depósito número EF5342562 (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>).

4.4 Detecção das carbapenemases SPM, IPM, VIM, KPC, NDM e OXA-48

A pesquisa de SPM, IPM, VIM, KPM, NDM e OXA-48 foi realizada por PCR multiplex nas 114 amostras positivas para *bla*_{OXA-51-like}. Não houve positividade para nenhuma dessas carbapenemases em nenhuma das amostras testadas.

4.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana por disco-difusão

A susceptibilidade dos 114 isolados de *A. baumannii* foi testada para os antimicrobianos amicacina (AK), cefepime (FEP), ceftazidima (CAZ), cefotaxime (CTX), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GN), levofloxacina (LEV), piperacilina-tazobactam (PTZ), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), ticarcilina-ácido clavulânico (TIM) e tobramicina (TOB) por meio da técnica de disco-difusão (Tabela 7).

Tabela 7- Classificação quanto a susceptibilidade dos 114 isolados de *A. baumannii* para os fármacos amicacina, cefepime, ceftazidima, cefotaxime, ciprofloxacina, gentamicina, levofloxacina, piperacilina-tazobactam, sulfametoxazol-trimetoprim, ticarcilina-ácido clavulânico e tobramicina

Antimicrobiano	Susceptíveis		Intermediários		Resistentes		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
AK	14	12,3	1	0,9	99	86,8	114	100
FEP	2	1,7	2	1,7	110	95,5	114	100
CAZ	2	1,7	6	5,2	106	93	114	100
CTX	0	0	2	1,7	112	98,2	114	100
CIP	2	1,7	0	0	112	98,2	114	100
GN	28	24,5	0	0	86	75,4	114	100
LEV	3	2,6	0	0	111	97,3	114	100
PTZ	3	2,6	0	0	111	97,3	114	100
SXT	40	35	0	0	74	64,9	114	100
TIM	4	3,5	0	0	110	96,5	114	100
TOB	38	33,3	0	0	76	66,6	114	100

Legenda: AK, amicacina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxime; CIP, ciprofloxacina; FEP, cefepime; LEV, levofloxacina; PTZ, piperacilina-tazobactam; SXT, sulfametoxazol-trimetoprim; TIM, ticarcilina-ácido clavulânico; TOB, tobramicina

4.6 Teste de susceptibilidade por Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Realizou-se CIM para os carbapenêmicos meropenem e imipenem por meio de E-test® para as 114 amostras do estudo, sendo que 94,7% delas mostraram-se resistente a ambos os carbapenêmicos. Todas as seis amostras sensíveis aos dois carbapenêmicos carregavam exclusivamente OXA-51-like, e o elemento IS*Aba1* foi identificado a montante do gene *bla*OXA-51-like em uma delas (1/6; 16,6%) (Tabela 8).

Tabela 8- Isolados susceptíveis a imipenem e meropenem carreadoras exclusivamente de OXA-51-like e sua relação com o elemento de inserção *ISAb_a1*, classificação quanto ao perfil de resistência e valores da CIM para imipenem e meropenem

Amostra	Imipenem (CIM µg/ml)	Meropenem (CIM µg/ml)	OXA-51- like	Correlação OXA-51-like/ <i>ISAb_a1</i>	NS	Perfil de sensibilidade
2	1	0.75	NR	sem associação	AK, CAZ, CTX, CIP, GN, FEP, LEV, PTZ, TIM, TOB, TG, TE, SAM	MDR
3	0.75	0.75	OXA-69	sem associação	AK, CAZ, CTX, CIP, FEP, LEV, PTZ, TIM, TOB, TE	MDR
30	0.5	1	OXA-70	<i>ISAb_a1</i> a montante	CAZ, CTX, CIP, FEP, LEV, PTZ, TIM, TOB, TG, TE	MDR
66	0.19	0.38	OXA-69	sem associação	CAZ, CTX, CIP, GN, FEP, TE, SAM	MDR
109	0.25	0.25	OXA-90	sem associação	CTX	S
110	0.25	0.75	OXA-78	sem associação	CTX	S

Legenda: NR, não realizado; NS, não-susceptibilidade (resistente ou intermediário); MDR, multirresistente; XDR, extensivamente resistente; S, sensíveis; AK, amicacina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxime; CIP, ciprofloxacina; FEP, cefepime; LEV, levofloxacina; PTZ, piperacilina-tazobactam; TIM, ticarcilina-ácido clavulânico; TOB, tobramicina; TE, tetraciclina; SAM, ampicilina-sulbactam.

Os valores calculados de CIM₅₀ e CIM₉₀ para as drogas imipenem, meropenem, tetraciclina, ampicilina-sulbactam, minociclina, tigeciclina e polimixina B, bem como a porcentagem de cepas sensíveis, com valores intermediários e resistentes a esses antimicrobianos constam na Tabela 9. Minociclina e polimixina B foram os fármacos que apresentaram maior atividade *in vitro*, tendo em vista que as cepas apresentaram 100% de susceptibilidade ambos com valores de CIM₅₀/CIM₉₀ de 0,25/0,5 e 0,5/1,5

µg/ml, respectivamente. A distribuição dos valores e o cálculo de CIM₅₀ e CIM₉₀ deu-se conforme a Tabela 9.

Tabela 9- Cálculo de CIM₅₀ e CIM₉₀ para os fármacos imipenem, meropenem, tetraciclina, ampicilina-sulbactam, minociclina, tigeciclina e polimixina B e classificação quanto a susceptibilidade dos isolados

Antimicrobiano	CIM ₅₀ µg/ml	CIM ₉₀ µg/ml	Susceptível		Intermediário		Resistente		Total	
			N	%	N	%	N	%	N	%
Imipenem	>32	>32	6	5,2	0	–	108	94,7	114	100
Meropenem	>32	>32	6	5,2	0	–	108	94,7	114	100
Tetraciclina	8	16	53	46,5	34	29,8	27	23,7	114	100
Ampicilina-sulbactam	16/8	32/16	25	21,9	45	39,5	44	38,6	114	100
Minociclina	0,25	0,5	114	100	0	–	0	–	114	100
Tigeciclina	2	3	73	64,3	41	35,7	0	–	114	100
Polimixina B	0,5	1,5	114	100	0	0	0	–	114	100

Legenda: CIM, concentração inibitória mínima

Diante dos resultados dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos, 40,3% dos isolados foram classificados como multiresistentes (MDR); 57,9% como extensivamente resistentes (XDR) e 1,7% foram considerados sensíveis segundo os critérios estabelecidos por Magiorakos e colaboradores (2012).

4.7 Tipagem molecular por PFGE

Pela metodologia de PFGE, observou-se que os 114 isolados se caracterizavam por 54 pulsotipos, distribuídos em 12 clusters definidos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K) e 12 outros perfis únicos, ou seja, que não atingiram 87% ou mais de similaridade com nenhuma outra cepa do estudo (Figura 5). O cluster que agregou o maior número de amostras foi o cluster A (similaridade de 87,1%), com 29 isolados em 13 pulsotipos (A1 a A13), seguido do cluster E (similaridade 88,5%), com 24 amostras distribuídas em 9 pulsotipos (E1 a E9), e cluster B (similaridade de 90,0%), com 10 amostras, 7 pulsotipos (B1 a B7) (Figura 5).

Figura 5 (página anterior). Dendrograma elaborado com um isolado representante de cada pulstipo definido a partir da análise do teste de PFGE. Relação entre pulstipos, número de amostras de cada pulstipo, STs e CCs definidos pela técnica de MLST

Legenda: ST, *sequence type*; CC, Complexo Clonal

Elaborou-se também um dendrograma para os quatro isolados identificados como *A. nosocomialis* (Figura 6) e outro para os dois isolados *A. pittii* (Figura 7). Dois isolados de *A. nosocomialis* tiveram similaridade de 88,2% e um isolado, também dessa espécie, foi classificado como MDR. Nos demais isolados foi observada susceptibilidade aos antimicrobianos.

Figura 6. Dendrograma resultante da análise do teste de PFGE dos isolados de *A. nosocomialis*, combinado aos dados de CIM para imipenem e merepenem, perfil de susceptibilidade, ano de isolamento e grupo de enfermarias referentes aos isolados.

Figura 7. Dendrograma resultante da análise do teste de PFGE dos isolados de *A. pittii*, combinado aos dados de CIM para imipenem e merepenem, perfil de susceptibilidade, ano de isolamento e grupo de enfermarias referentes aos isolados.

4.8 Determinação Grupo Clonal pela técnica 3LST

4.8.1 Teste de 3LST segundo interpretação de Karah et al., 2012

O teste de 3LST foi realizado para as 114 amostras de *A. baumannii*. As amostras foram distribuídas nos grupos G1, G2, G4, G5, G8, G12, G13 e G14, além de 18 isolados não classificados (NC), apresentando perfis não descritos (Karah et al., 2012). O Grupo Clonal que englobou o maior número de cepas foi o G5, com 34 cepas (29,8%), seguido pelo Grupo Clonal 1 (Clone Internacional II) com 17 isolados (14,9%). O Grupo Clonal 2 (Clone Internacional I) identificou 13 cepas do estudo (11,4%). O Grupo Clonal 8 agrupou 14 cepas (12,3%), nove cepas (7,9%) foram identificadas como Grupo Clonal 4 e cinco cepas tiveram perfil de Grupo Clonal 14 (4,4%); três cepas (2,6%) foram pertencentes ao Grupo Clonal 12 e apenas uma ao Grupo Clonal 13 (0,9%) (Tabela 10).

Tabela 10- Distribuição dos isolados e das oxacilinases entre os Grupos Clonais segundo Karah et al., 2012

Grupo Clonal	Frequência		Genes de oxacilinases detectados
	N	%	
G1 (ICII)	17	14,9	<i>blaOXA -51-like</i> , <i>blaOXA -23-like</i>
G2 (ICI)	13	11,4	<i>blaOXA -51-like</i> , <i>blaOXA -23-like</i>
G5	34	29,8	<i>blaOXA -51-like</i> , <i>blaOXA -23-like</i> , <i>blaOXA-72</i>
G4	9	7,9	<i>blaOXA -51-like</i> , <i>blaOXA -23-like</i>
G8	14	12,3	<i>blaOXA -51-like</i> , <i>blaOXA -23-like</i>
G12	3	2,6	<i>blaOXA -51-like</i> , <i>blaOXA -23-like</i>
G13	1	0,9	<i>blaOXA -51-like</i> , <i>blaOXA -23-like</i>
G14	5	4,4	<i>blaOXA -51-like</i> , <i>blaOXA -23-like</i>
NC	18	15,8	<i>blaOXA -51-like</i> , <i>blaOXA -23-like</i> , <i>blaOXA-231</i>
Total	114	100	

Legenda: NC, não classificado; IC I, International Clone I; IC II, International Clone I

4.8.2. Teste de m3LST segundo Martins et al., 2016

A técnica de m3LST foi realizada com os 66 isolados representantes de cada pulsotipo determinado por PFGE. O agrupamento com o maior número de isolados foi o complexo clonal CC79, com (n=28; 42,4%), seguido pelo complexo clonal CC1 (n=12; 18,2%). Sete isolados tiveram o perfil CC15 (10,6%); dois isolados tiveram o perfil CC25 (3%) e um, CC2 (1,5%). O restante dos isolados (n=17; 24,2%), não puderam ser classificados por esta metodologia por apresentarem perfis diferentes aos reportados. Os perfis de amplificação dos 17 isolados não classificados pela técnica de m3LST, bem como seus respectivos STs definidos por MLST encontram-se na Tabela 12.

Tabela 11- Distribuição dos isolados e das oxacilinases entre os Grupos Clonais segundo Martins et al., 2016

Complexo Clonal	Interpretação					Frequência		Genes de oxacilinases detectados
	<i>ompA</i>		<i>csuE</i>		<i>bla</i> _{OXA-51-like}	N	%	
	327	423	239	531	114			
CC79	+	+	-	-	-	28	42,4	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-23-like} , <i>bla</i> _{OXA-24-like}
CC1	-	-	+	+	-	12	18,2	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-23-like}
CC15	-	+	-	-	+	7	10,6	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-23-like}
CC2	-	+	-	-	-	1	1,5	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-23-like}
CC25	-	-	+	-	+	2	3	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-23-like}
NC	Outras combinações					17	24,2	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-23-like} , <i>bla</i> _{OXA-143-like}
Total						66	100	

Legenda: CC, Complexo Clonal; NC, não classificado

Tabela 12- Características dos isolados não classificados pela técnica de m3LST (Martins et al., 2016) e seus respectivos STs (Instituto Pasteur)

Número do isolado	m3LST (Martins et al., 2016)					MLST (ST)
	<i>ompA</i>		<i>csuE</i>		<i>bla_{OXA}-51-like</i>	
	327 pb	423 pb	239 pb	531 pb	114 pb	
04	-	-	-	+	-	317
07	-	-	-	+	-	317
11	-	-	-	+	-	317
13	-	-	-	+	-	317
14	-	-	-	+	-	317
18	-	-	-	+	-	317
19	-	-	-	+	-	317
22	-	-	-	+	-	317
25	-	-	-	-	+	15
26	-	-	-	+	-	317
30	-	-	-	-	+	584
32	-	-	-	+	-	317
42	-	-	-	-	+	15
77	-	-	-	+	-	317
79	-	-	-	+	-	317
133	-	-	-	-	+	107

4.9 Tipagem molecular por MLST

A técnica de MLST, segundo o protocolo do Instituto Pasteur, dividiu os isolados em 14 STs (ST1, ST15, ST22, ST25, ST78, ST79, ST107, ST175, ST203, ST317, ST584, ST730, ST945, ST986) e quatro Complexos Clonais (CC1, CC15, CC25 e CC79), conforme sumarizado na Tabela 13. O complexo clonal que agrupou o maior número de amostras foi o CC79 (42,4%), seguido pelo CC1 (16,6%) e pelo sequence type ST317 (18,2%).

Tabela 13- Relação dos STs identificados no estudo pela técnica de MLST (Instituto Pasteur), dos Complexos Clonais e a distribuição dos isolados entre eles

ST	Alelos							CC	Frequência	
	<i>cpn60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltA</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>		N	%
1	1	1	1	1	5	1	1	1	10	15,1
986	1	1	1	1	5	4	1		1	1,5
15	6	6	8	2	3	5	4	15	8	12,1
79	26	2	2	2	29	4	5		5	7,6
175	26	1	2	2	29	4	5	79	1	1,5
730	26	6	2	2	29	4	5		22	33,4
25	3	3	2	4	7	2	4	25	1	1,5
945	3	3	2	4	7	4	4		1	1,5
22	3	9	3	2	4	1	9	Singleton	1	1,5
78	25	3	6	2	28	1	29	Singleton	1	1,5
107	34	35	37	2	5	6	36	Singleton	1	1,5
203	3	4	2	1	7	1	2	Singleton	1	1,5
317	3	1	15	2	40	4	4	Singleton	12	18,2
584	7	3	2	1	8	4	4	Singleton	1	1,5

Legenda: ST, *sequence type*; CC, complexo clonal

Notou-se uma boa correlação (95,6%) entre as técnicas de MLST e m3LST, tendo em vista que apenas cinco isolados (4,4%) não foram classificados no mesmo complexo clonal por ambas as técnicas (Tabela 14).

Tabela 14- Correlação entre os resultados de agrupamento da amostragem em Complexos Clonais pela técnica de m3LST (Martins et al., 2016) e MLST

Complexos Clonais m3LST	MLST Instituto Pasteur															Total
	CC	1		15		79		25		Singleton						
	ST	1	986	15	79	175	730	25	945	22	78	107	203	317	584	
CC1		10	1								1					12
CC2										1						1
CC15				6									1			7
CC79					5	1	22									28
CC25								1	1							2
NC				2								1		12	1	16
Total		10	1	8	5	1	22	1	1	1	1	1	1	12	1	66

Legenda: CC, Complexo Clonal; ST, *sequence type*; cinza: concordância de resultados; amarelo: classificado erroneamente pelo m3LST

Essa correlação, entretanto, foi baixa (30,3%) entre os agrupamentos resultantes da técnica de 3LST original e do MLST, sendo que a maior concordância deu-se em relação ao CC1 (Tabela 15).

Tabela 15- Correlação entre os resultados de agrupamento da amostragem em Complexos Clonais pela técnica de 3LST (Turton et al., 2006) e MLST.

Grupos Clonais	MLST Instituto Pasteur															Total
	3LST	CC	1	15	79	25	Singleton									
		ST	1	986	15	79	370	175	25	945	317	22	78	203	107	
G1				2		6		1								9
G2		10	1												1	12
G5					5	13	1									19
G4				3		2										5
G8										6						6
G12				1						1						2
G14				2		1			1							4
NC										5	1	1	1	1		9
Total		10	1	8	5	22	1	1	1	12	1	1	1	1	1	66

Legenda: CC, Complexo Clonal; ST, *sequence type*; cinza: concordância de resultados; amarelo: classificado erroneamente pelo 3LST

Houve também notável correlação entre os agrupamentos em Complexos Clonais por MLST e os clusters definidos pela técnica de PFGE. O maior agrupamento deu-se entre os clusters A, B e C, os quais reuniram isolados pertencentes ao CC79 e concentraram-se majoritariamente no agrupamento da UTI Adulto (20,3%). O agrupamento a reunir o maior número de isolados e uma maior variedade de clusters e Complexos Clonais foi o das enfermarias (Tabela 16).

Tabela 16- Correlação entre os clusters definidos por PFGE e Complexos Clonais determinados por MLST e sua distribuição entre os agrupamentos de enfermarias do HC-FMB

Clusters/CC	Grupo de enfermarias										Total	
	Ambulatório		Enfermarias		UTI Adulto		UTI Infantil		NI			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
ABC/CC79			12	10,6	23	20,3	2	1,7	5	4,4	42	37,1
DE/CC79			1	0,9							1	0,9
DE/ST317	2	1,7	22	19,5	2	1,7					26	23
FG/CC15			4	3,5	6	5,3	1	0,9			11	9,7
FG/CC79					2	1,7					2	1,7
H/CC79			2	1,7	3	2,6	1	0,9			6	5,3
H/ST22			2	1,7							2	1,7
I/ST107			2	1,7							2	1,7
JK/CC1			7	6,2	2	1,7					9	7,9
Outros perfis			8	7	2	1,8	1	0,9	1	0,9		
Total	2	1,7	60	52,8	40	35,1	5	4,4	1	0,9	113	100

Legenda: CC, Complexo Clonal; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; NI, não informado

Ao longo dos anos, foi observada uma substituição dos isolados singletons ST317, altamente prevalentes até o ano de 2010, pelo CC79 (Figura 8).

Figura 8. Distribuição dos Complexos Clonais definidos pela técnica de MLST segundo o protocolo do Instituto Pasteur no período do estudo.

Legenda: CC, Complexo Clonal; ST, *sequence type*

Foi observada uma correspondência entre os alelos sequenciados de *bla_{OXA-51-like}* e os Complexos Clonais aos quais esses 31 isolados pertencem, conforme predito por Pournaras e colaboradores (2014) (Tabela 17).

Tabela 17- Correspondência entre os alelos sequenciados de OXA-51-like, os STs e os Complexos Clonais definidos pela técnica de MLST

Alelo OXA-51-like	Frequência		ST	CC (Instituto Pasteur)
	N	%		
OXA-65	5	16,1	ST79 ST730	CC79
OXA-69	11	35,5	ST1 ST986	CC1
OXA-88	12	38,7	ST317	Singleton
OXA-70	1	3,2	ST584	Singleton
OXA-78	1	3,2	ST203	Singleton
OXA-90	1	3,2	ST78	Singleton
Total	31	100		

Legenda: CC, Complexo Clonal; ST, *sequence type*

Os resultados obtidos encontram-se compilados a seguir (Tabela 18), sendo possível notar a diversidade de clusters existentes, a alta disseminação de *bla*_{OXA23-like} e a prevalência de isolados pertencentes ao Complexo Clonal CC79.

Tabela 18- Detecção das oxacilinasas e do elemento de inserção IS*Aba1* por PCR; no cálculo de CIM₅₀ e CIM₉₀ para os antimicrobianos imipenem, meropenem, tetraciclina, ampicilina-sulbactam, minociclina e polimixina B; para a definição de clusters através da técnica de PFGE, do agrupamento das amostras pelos métodos de 3LST de Karah e colaboradores (2012) e Martins e colaboradores (2016); definição de STs e Complexos Clonais por MLST em *A. baumannii* (n=102)

Cluster PFGE	Anos	Enfermarias	Número de Isolados	Pulsotipos	Genes OXA	CIM ₅₀ CIM ₉₀							Perfil de resistência	Grupo Clonal Karah et al.	Complexo Clonal Martins et al.	ST	Complexo Clonal MLST
						IMP	MEM	TG	TE	SAM	MIN	PB					
A	2011-2014	7	29	13	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-65} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	>32 >32	>32 >32	3 3	8 16	16/8 32/16	0,5 0,5	0,5 1,5	MDR, XDR	G5,G1	CC79	ST730	CC79
B	2014	4	10	7	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-65} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	>32 >32	>32 >32	3 3	4 8	32/16 32/16	0,25 0,25	0,5 0,8	MDR, XDR	G1, G4, G5, G14, NC	CC79	ST79	CC79
C	2011	2	3	2	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-65} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	>32 >32	>32 >32	3 3	16 16	16/8 16/8	0,5 0,5	0,5 0,5	XDR	G5,G1	CC79	ST730	CC79
D	2010-2011	4	4	3	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-88} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	>32 >32	>32 >32	0,75 1	4 8	8/4 16/8	0,13 0,13	0,5 0,5	MDR, XDR	G8, G12, NC	NC	ST317	Singleton
E	2008-2014	14	24	9	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-88} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	>32 >32	>32 >32	1,5 2	4 8	8/4 32/16	0,06 0,13	0,5 1	MDR, XDR	G5, G8, NC	CC79, NC	ST317, ST730,	CC79, Singleton
F	2007,2011, 2013	5	7	6	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-23-like}	>32 >32	>32 >32	1 1,5	16 32	16/8 >32/16	0,25 0,25	0,5 1,5	MDR, XDR	G1, G4, G5, G12, G14	CC15, CC79, NC	ST15, ST730	CC15, CC79
G	2012-2013	2	6	2	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-23-like}	>32 >32	>32 >32	1,5 2	16 32	32/16 32/16	0,25 0,5	0,4 1,5	MDR, XDR	G4	CC15	ST15	CC15
H	2012-2013	6	8	4	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-65} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	>32 >32	>32 >32	2 3	8 16	16/8 32/16	0,5 0,5	0,4 0,8	MDR, XDR	G4, G5, NC	CC79, CC2	ST79, ST22	CC79, Singleton
I	2009	2	2	1	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-231}	>32 >32	>32 >32	0,75 1	2 4	8/4 16/8	0,06 0,06	0,4 0,4	MDR	NC	NC	ST107	Singleton
J	2013-2014	2	5	4	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-69} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	>32 >32	>32 >32	3 3	4 8	32/16 32/16	0,5 2	0,8 1,5	MDR, XDR	G2	CC1	ST1	CC1
K	2013-2014	2	4	4	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-69} <i>bla</i> _{OXA-23-like}	>32 >32	>32 >32	2 3	4 8	32/16 32/16	0,5 0,5	0,5 1,5	MDR, XDR	G2, NC	CC1	ST1, ST986	CC1

Legenda: PFGE, *pulsed field gel eletrophoresis*; 3LST, *trilocus sequence typing*; CIM, concentração inibitória mínima; IMP, imipenem; MEM, meropenem; TE, tetraciclina, SAM, ampicilina-sulbactam; MIN, minociclina; PB, polimixina B, NC, não classificado; ST, sequence type. XD, extremamente resistente; MDR, multiresistente

5 DISCUSSÃO

Neste estudo verificamos a alta prevalência de *bla*_{OXA-23-like} em cepas MDR e XDR isoladas de pacientes com bacteremias causadas por *Acinetobacter* spp. em um hospital de ensino (HC-FMB), com predomínio dos Complexos Clonais CC1, CC15, CC79 e do ST317.

Dentre as espécies de *Acinetobacter* causadoras de IRAS, *A. baumannii* é a mais frequente, e, na amostragem deste estudo, 89,8% dos isolados foram identificados como pertencentes a essa espécie através de metodologias moleculares (detecção dos genes *bla*_{OXA-51-like} e *gltA*, bem como sequenciamento dos genes *rpoB* e região ITS). A diversidade de espécies encontradas neste estudo é condizente com relatos da literatura, os quais indicam também o papel das espécies *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. ursingii* e *A. bereziniae* (Fujikura et al., 2016; Lee et al. 2015b; Wisplinghoff et al., 2012) como agentes etiológicos de infecções de corrente sanguínea. Embora seja reconhecido que espécies não-*baumannii* sejam também causadoras de IRAS, *A. baumannii* apresenta pior prognóstico comparado às demais espécies e também maiores taxas de resistência aos antimicrobianos (Chatterjee et al., 2016; Tien et al., 2012; Wisplinghoff et al., 2012). Essas discrepâncias entre as espécies evidenciam a importância da correta identificação do agente infeccioso, fato que pode ter grande impacto no tratamento e, consequentemente, no prognóstico do paciente (Leão et al., 2016; Marra et al., 2011).

Uma das metodologias empregadas para identificação de *A. baumannii* consiste na detecção do gene *bla*_{OXA-51-like}, considerado intrínseco a esta espécie (Turton et al., 2006). Embora relatos pontuais indiquem que este gene pode estar associado a plasmídeos e, por este motivo, transferir-se horizontalmente a outras espécies (Chen et al., 2010; Lee et al., 2009; Saranathan et al., 2014), esta metodologia é aceita e foi validada por diferentes autores (Camargo et al., 2016; Chen et al., 2014; Ghajavand et al., 2015). Em nosso estudo, utilizamos também a detecção do gene *gltA*, que foi preconizado por Wong, Chua e Thong (2014) para identificação de *A. baumannii* em uma reação de real time PCR multiplex (Wong, Chua e Thong, 2014). A fim de se confirmar a identificação, sequenciamos também a região ITS, o gene *rpoB*

e/ou gene 16S rRNA em uma amostragem de isolados escolhidos aleatoriamente e carreadores de *bla*_{OXA-51-like}, e em todos os isolados negativos para este gene de oxacilinase. Houve concordância entre a presença do gene *bla*_{OXA-51-like} e a identificação por sequenciamento. Além de válido para a identificação de *A. baumannii*, o gene *bla*_{OXA-51-like} codifica a oxacilinase que pode desempenhar um papel de carbapenemase de baixos níveis, particularmente quando associada à sequência de inserção *ISAba1* e outros mecanismos de resistência, como porinas e bombas de efluxo (Evans e Amyes, 2014; Mostachio et al., 2012; Rumbo et al., 2013).

Em nossa amostragem, *ISAba1* foi identificado a montante de *bla*_{OXA-51-like} em 21,7% dos isolados. Contudo, a associação de *ISAba1* a montante do gene codificador de OXA-51-like não parece garantir a resistência antimicrobiana em *Acinetobacter*, tendo em vista alguns trabalhos que encontraram esse elemento de inserção a montante do gene em cepas sensíveis a carbapenêmicos (Pagano et al., 2013). Consoante a esse estudo, em uma das seis amostras carreadoras exclusivamente de *bla*_{OXA-51-like} de nossa amostragem, foi identificado o elemento *ISAba1* a montante de *bla*_{OXA-51-like}, mesmo essa tendo apresentado sensibilidade a imipenem e meropenem. As demais seis amostras carreadoras exclusivamente de OXA-51-like, mas sem associação a *ISAba1*, mostraram-se também sensíveis a esses antimicrobianos. Tal perfil de sensibilidade dialoga com as pesquisas sugestivas de que as enzimas OXA-51-like não sejam capazes de conferir, por si só, resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* (Hértier et al., 2005; Pagano et al., 2013).

Tem-se observado que as variantes de *bla*_{OXA-51-like} são consideravelmente conservadas dentro da maioria dos Complexos Clonais, estabelecendo-se uma boa correlação entre os alelos desse gene e os Complexos Clonais definidos pela técnica de MLST. Esse paralelismo possibilita que o sequenciamento do alelo *bla*_{OXA-51-like} tenha aplicação epidemiológica, tendo a vantagem de que o sequenciamento de um único gene é mais rápido e menos custoso quando comparado ao sequenciamento dos sete alelos necessários ao MLST (Pournaras et al., 2014). Os resultados do

sequenciamento do gene *bla*_{OXA-51-like} em amostragem de 31 isolados tiveram boa correspondência com o trabalho de Pournaras e colaboradores (2014), o qual relaciona os alelos de *bla*_{OXA-51-like} a Complexos Clonais específicos. Essa correlação deu-se de forma que os isolados nos quais foi identificada OXA-69 pertenciam ao CC1, os isolados carreadores de OXA-65 pertenciam ao CC79 e o isolado carreador de OXA-90 foi caracterizado como singleton e ST78. Os isolados nos quais a OXA-88 foi identificada foram caracterizados como pertencentes ao ST317. Embora a variante OXA-88 não tenha sido incluída no trabalho de Pournaras e colaboradores (2014), o estudo nacional de Camargo e colaboradores (2016) também identificou a relação entre essa variante enzimática e o ST317. Dessa maneira, o sequenciamento dos alelos *bla*_{OXA-51-like} parece funcionar como ferramenta para a predição dos Complexos Clonais.

Se por um lado o papel das variantes OXA-51-like na manifestação do fenótipo de resistência aos carbapenêmicos não é tão significativo, outras enzimas oxacilinasas apresentam capacidade hidrolítica mais expressiva. Os genes das oxacilinasas estão distribuídos diferentemente pelo globo (Peleg, Seifert e Paterson, 2008), sendo que o gene *bla*_{OXA-23-like} é o predominante no Brasil, altamente difundido. Neste estudo, foi possível verificar essa disseminação, tendo em vista que *bla*_{OXA-23-like} foi identificado em amostras componentes da maioria dos clusters definidos pela técnica de PFGE (90,9%) e de todos os Complexos Clonais, salvo os isolados singletons (29,4%). O único cluster no qual não houve isolados carreadores de *bla*_{OXA-23-like} foi o cluster I, constituído exclusivamente pelos dois isolados carreadores de *bla*_{OXA-231}, ambos caracterizados pelo mesmo singleton ST (ST107).

A respeito de *bla*_{OXA-231} existem divergências quanto a alta ou baixa disseminação do gene pelo território nacional. Alguns autores alegam que sua disseminação pelo país ainda é baixa, como o trabalho de Werneck e colaboradores em 2011 (Werneck et al., 2011b) e o de Clímaco e colaboradores (2013). Em contrapartida, Antonio e colaboradores (2011) e Mostachio e colaboradores (2012) relatam em seus trabalhos uma prevalência de *bla*_{OXA-143-like} de 58,3% e 76%, respectivamente, em suas amostragens. Essa dissensão aponta uma variação na prevalência de *bla*_{OXA-143-like} no país

dependendo do hospital ou da região estudados, ressaltando a importância de medidas de contenção da disseminação de patógenos e da vigilância epidemiológica. No presente trabalho, a ocorrência de amostras carreadoras de *bla*_{OXA-231} foi baixa (n= 2; 1,7%) e o perfil delas, clonal (100% similaridade), sendo ambas caracterizadas como ST107. Ainda assim, tem-se observado a crescente disseminação de variantes desse gene pelo Brasil (Camargo et al., 2016; de Sá Cavalcanti et al., 2016; Gionco et al., 2012, Girlich et al. 2014), fato que tem elevado *bla*_{OXA-143-like} ao posto de segundo gene codificador de CHDL mais frequente em *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos no país (Pagano, Martins e Barth, 2016). A variante OXA-231 foi pioneiramente detectada em um isolado proveniente do Paraná em 2007 e posteriormente reportada na região metropolitana de São Paulo em um isolado de 2010 (Camargo et al., 2016; Gionco et al., 2012). As duas amostras carreadoras de OXA-231 deste estudo foram isoladas no ano de 2009 em Botucatu, interior do estado de São Paulo, sugerindo a disseminação do gene *bla*_{OXA-231} pelo território nacional ainda no início da década de 2010.

A amostra carreadora de OXA-72 caracterizou um perfil único pela técnica de PFGE, além de ter sido enquadrada no ST79 e CC79. Essa oxacilinase foi registrada pontualmente em várias regiões do Brasil e foi também pontualmente identificada em nosso estudo em um único isolado de 2010. Esse resultado é concordante com o descrito pela literatura, visto que, até o presente, OXA-72 é a única variante de OXA-24/40-like identificada em nosso país (Antonio et al., 2011; de Sá Cavalcanti et al., 2013; Pagano, Martins e Barth, 2016) e parece ainda ser identificada com baixa frequência.

Das amostras carreadoras de *bla*_{OXA-23-like}, 82,8% apresentaram o elemento de inserção *ISAba1* a montante do gene. Este achado, aliado à alta resistência dos isolados desse estudo a imipenem e meropenem e à ausência de outras enzimas carbapenemases, corrobora com o fato de que a associação entre elementos de inserção e oxacilinasas transferíveis é o que melhor parece caracterizar a resistência a carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp. (Fonseca et al., 2013; Pagano, Martins e Barth, 2016).

A alta taxa de *Acinetobacter* MDR, XDR e resistentes a carbapenêmicos verificada entre os isolados acompanha os dados da literatura mundial que apontam a crescente resistência desse patógeno à maioria dos fármacos disponíveis (Gales et al., 2011; Karageorgopoulos e Falagas, 2008; Poirel e Nordmann, 2006; Prado et al., 2014; Su et al., 2012; Waheram et al., 2008). A evolução desse fenótipo resistente evidencia a importância do monitoramento dos perfis genéticos das cepas circulantes, como a identificação dos Complexos Clonais bem-sucedidos e das OXA-enzimas recorrentes em determinada região.

Neste estudo, os fármacos minociclina e polimixina B tiveram alta eficiência *in vitro*, tendo em vista que 100% dos isolados mostraram-se susceptíveis a ambas. Esses antimicrobianos são comumente eficientes contra *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos, muito embora uma crescente resistência já esteja sendo observada, inclusive no Brasil (Cheah et al., 2016; Clímaco et al., 2013; Genteluci et al., 2017; Liu et al., 2016; Pournaras et al., 2017; Wang et al. 2016). Não foi verificada resistência a tigeciclina, apesar de este fenótipo mostrar-se progressivamente mais usual em *A. baumannii* no país (Cardoso et al., 2016; Vasconcellos et al., 2017b). A progressão de tal resistência culminou na publicação de uma meta-análise que desaconselha o tratamento baseado nesse fármaco para infecções por *A. baumannii* MDR (Ni et al., 2016). Ainda assim, no presente trabalho, 35,7% dos isolados foram considerados intermediários, um possível indício do rumo de *Acinetobacter* à resistência a tigeciclina. Essa tendência tem sido notada também no cenário mundial, visto o crescente registro de *A. baumannii* com valores intermediários ou resistentes à tigeciclina, muito embora este ainda seja um fármaco de escolha para o tratamento de infecções por *A. baumannii* MDR ou XDR (Nowak et al., 2017; Park et al., 2017; Vasconcellos et al. 2017b, Vega e Dowzicky, 2017).

Estudos anteriores mostram que a disseminação do perfil da resistência antimicrobiana está frequentemente associada a perfis bacterianos clonais (Clímaco et al., 2013; Li et al., 2015; Sevillano et al., 2012). No trabalho de Vasconcellos e colaboradores (2017b) é possível verificar a disseminação do

fenótipo resistente de *A. baumannii* nos diferentes Complexos Clonais propagados no Brasil. Ao passo disso, neste presente estudo verificamos a diversidade de clones circulantes entre as amostras de *A. baumannii* XDR ou MDR, com resistência detectada a diversos antimicrobianos.

Através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) foi possível observar a diversidade do perfil genético entre as amostras deste trabalho, as quais se distribuíram em 11 clusters (A-K) (compondo 88,6% da casuística), além de outros 11 perfis únicos (identificados em isolados individuais). No início do estudo, supunha-se que o caso índice responsável pela introdução do perfil de resistência aos carbapenêmicos das espécies do Complexo ACB no HC-FMB fosse um isolado de secreção traqueal de 2007, pertencente ao cluster F. Entretanto, a análise por PFGE não aponta a disseminação deste perfil entre os isolados de infecção de corrente sanguínea, ao contrário do ocorrido com o surgimento do cluster E em 2008. O cluster E então manteve-se presente em todos os anos seguintes até o final da análise deste estudo (2014), embora o número de isolados representantes desse cluster tenha decrescido com o tempo. O fato de este estudo ter incluído apenas amostras de sangue ou ponta de cateter pode explicar, pelo menos em partes, o motivo de não termos observado a disseminação do clone F, suposto caso-índice. Isso porque este isolado foi proveniente de cultura de secreção traqueal, material clínico que não foi objeto de estudo deste levantamento. Já os fatores associados com a persistência dos clones pertencentes ao CC79 continuam desconhecidos, e poderão ser melhor elucidados com informações clínicas dos hospedeiros e/ou maiores informações do patógeno

O maior cluster deste estudo (cluster A) foi composto de 28 isolados, todos pertencentes ao CC79. À maneira deste, outros clusters também se estruturaram por isolados pertencentes a um único Complexo Clonal. Partindo disso, elaboramos cinco agrupamentos de cluster/CC (ABC/CC79, DE/ST317, FG/CC15, H/CC79, JK/CC1) a fim de melhor analisar a distribuição de clusters e Complexos Clonais ao longo do tempo e entre as enfermarias do HC-FMB. Através dessa relação, é possível verificar o agrupamento de cepas com o mesmo perfil genético tanto pela técnica de PFGE quanto de MLST,

organizando-as em perfis clonais. A comprovação dessa relação de clonalidade ressalta a importância de programas de vigilância epidemiológica e de maiores medidas para o controle de infecções em um hospital.

As amostras foram agregadas em nove Grupos Clonais segundo o protocolo de Turton e colaboradores (2006) e a interpretação de Karah e colaboradores (2012) para a técnica de 3LST, inclusive no Grupo Clonal 2 (11,4%). É sabido que este grupo tem pouca representatividade no Brasil, contudo, tal discordância pode ser justificada conforme os achados do grupo de Martins e colaboradores (2016). Nos estudos para o desenvolvimento de sua técnica de m3LST, esse grupo identificou que algumas amostras foram erroneamente classificadas como pertencentes a G2 pelo protocolo de Turton e colaboradores (2006), pois pertenciam a clones comumente circulantes no Brasil, não sendo corretamente identificados pelos padrões europeus (Martins et al., 2016). O grupo verificou que tais amostras na verdade pertenciam aos Complexos Clonais CC79, CC15 e CC25.

O protocolo de Martins e colaboradores (2016) classificou as amostras majoritariamente como correspondentes aos Complexos Clonais CC79, CC1 e CC15. Esses resultados são condizentes com os trabalhos que apontam a prevalência destes Complexos Clonais em isolados brasileiros, além de ter sido verificada a presença de dois isolados pertencentes ao CC25, também circulante no país. (Camargo et al., 2016; Chagas et al., 2014; Clímaco et al., 2013; Martins et al., 2016). A correspondência dessa técnica aos resultados obtidos por MLST foi recentemente validada por Vasconcellos e colaboradores (2017a), fato que reforça a confiabilidade do protocolo desenvolvido por Martins e colaboradores (2016).

Diante desses resultados, evidencia-se a dificuldade de aplicação da técnica de 3LST quando aplicada à realidade brasileira. Em contrapartida, a adaptação dessa técnica realizada pelo grupo de Martins (2016) mostrou-se bastante eficiente, podendo ser realmente útil como *screening* em laboratórios com poucos recursos, tendo em vista que os resultados obtidos por essa técnica tiveram boa correlação com os obtidos pelo PFGE e MLST.

Os complexos clonais identificados por MLST predominantes entre isolados foram, segundo o protocolo do Instituto Pasteur, CC1, CC15 e CC79, em concordância ao relatado na literatura como sendo os clones comumente circulantes no Brasil (Cardoso et al., 2016; Chagas et al., 2014; Vasconcellos et al., 2017a). Dois isolados foram pertencentes ao CC25, o qual aparenta configurar um clone emergente em nosso país. Houve um ST bastante recorrente em nossa amostragem, ST317, o qual não pertence ainda a um complexo clonal, mas que parece estar se disseminando pela região sudeste. Isso porque em 2016 este ST foi reportado como singleton, enquanto atualmente já possui um SLV na mesma região geográfica, dando indícios de sua microevolução contemporânea (Camargo et al., 2016; Vasconcellos et al., 2017a). Outro ST que merece destaque é o ST107, referente aos dois isolados carreadores de OXA-231. No Brasil, parece haver uma relação entre essa oxacilinase e o ST107, ainda que existam trabalhos no exterior o vinculando a outras oxacilinas (Camargo et al., 2016; da Costa, 2015; Jeannot et al., 2014; Mahamat et al., 2016). Dentre os isolados componentes do CC79, a maioria pertenceu ao ST730, um SLV do ST79. Apesar de todas as amostras ST730 serem carreadoras de OXA-23-like, uma amostra ST79 era carreadora da única OXA-72 identificada neste estudo. Tal achado coincide com os resultados de Pagano e colaboradores (2016b), os quais registraram a emergência de *A. baumannii* ST730 carreador de OXA-72. A prevalência do CC79 no Brasil parece ganhar relevância na atualidade. Entre os estudos brasileiros que realizaram esta tipagem, este Complexo Clonal é apontado como um dos mais frequentes no território nacional, além do CC1 e CC15 (Camargo et al., 2016; Chagas et al., 2014; Clímaco et al., 2013; Moreira et al., 2017).

Em nossa casuística, observamos a alteração da prevalência dos clones de *A. baumannii* em um único hospital. A análise da distribuição dos Complexos Clonais da amostragem ao longo dos anos compreendidos por este estudo permitiu-nos notar a gradual suplantação do ST317 (predominante entre 2007 e 2009) pelo CC79 (particularmente do ST730) a partir do ano de 2010. Estudos longitudinais, como o presente, propiciam esse tipo de observação

temporal, possibilitando o entendimento da dinâmica de dispersão dos clones e prevalência de fenótipos de resistência.

Tomados juntos, os resultados deste estudo nos fornecem uma caracterização detalhada das espécies de *Acinetobacter*, de sua susceptibilidade antimicrobiana e dos clones de *A. baumannii* causadores de infecções de corrente sanguínea em pacientes hospitalizados. A ocorrência de apenas dois fármacos (minociclina e polimixina B) com alta atividade contra estes isolados e a identificação de linhagens clonais na amostragem indica a necessidade de medidas efetivas de controle para diminuir a incidência destes patógenos tão importantes no ambiente hospitalar.

6 CONCLUSÕES

- Além de *A. baumannii*, outras espécies do Complexo ACB (*A. nosocomialis*, *A. pittii*) e ainda, outras espécies de *Acinetobacter* foram isoladas de pacientes com bacteremias internados no HC-FMB.
- As enzimas oxacilinasas mais frequentemente identificadas foram as do grupo OXA-23-like, seguidas por OXA-231 e OXA-72, o que não apenas confirma a alta disseminação de OXA-23-like pelo Brasil, como também denota a emergência de outras oxacilinasas pelo território nacional.
- Enzimas do grupo OXA-23-like muito frequentemente foram identificadas associadas ao elemento de inserção IS*Aba1*.
- A maior parte dos isolados do estudo (57,9%) foi classificada como extensivamente resistente (XDR).
- Os únicos fármacos com 100% de atividade *in vitro* testados neste estudo foram minociclina e polimixina B; alguns isolados apresentaram resultados intermediários para tigeciclina, embora resistência a este fármaco não tenha sido detectada.
- Os Complexos Clonais predominantes identificados nesse estudo foram CC1, CC79 e CC15, além da presença do CC25, relacionados a clusters específicos de PFGE.
- O singleton ST317 teve grande representatividade entre os isolados desse estudo durante os anos de 2007 e 2009, aparentando ser um ST de circulação nacional.
- Houve uma preponderância do CC79 ao longo do tempo, com destaque ao ST730.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980 May 16;289(1036):321-31.

Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, Elmor de Araújo MR e Lincopan N. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*_{OXA-143} gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:1322-1323.

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Informativo - Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº09.2014.

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Informativo - Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº14. 2016.

Bacterio. Net – <http://www.bacterio.net>, acesso em 24/09/2017.

Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MAD, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4382-4390.

Beijerinck MW. Über Pigmentbildung bei Essigbakterien. *Centr Bakteriol Parasitenk Abt.* 1911;167-76.

Bonomo RA e Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 2006; 43 Suppl 2:S49-56.

Bouvet P, Grimont P. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. 1986. Int J Syst Evol Microbiol 36:228-240.

Brisou J, Prevot AR. [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group]. 1954. Ann Inst Pasteur (Paris). 86:722-728

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;11:15-23.

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:969-976.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:1211-33.

Camargo CH, Tiba MR, Saes MR., Vasconcellos FM, Santos LF, Romero EC, Garcia DO. Population Structure Analysis of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Brazil Reveals Predominance of

Clonal Complexes 1, 15, and 79. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:2545-7.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005;63:219-28.

Carattoli A. Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2227-2238.

Cardoso JP, Cayô R, Girardello R, Gales AC. Diversity of mechanisms conferring resistance to β -lactams among OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clones. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;85(1):90-7.

Carvalho KR, Carvalho-Assef APD, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi M.D. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34:25–28.

Carvalho KR, Gomes DBC, Genteluci GL, de Souza MJ, Zahner V, Maria Villas Bôas MHS. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in a Public Hospital in Brazil: a case report. 28^o Congresso Brasileiro de Microbiologia; 2015; Florianópolis-SC. *Anais.*

Cayô R, Merino M, Ruiz Del Castillo B, Cano ME, Calvo J, Bou G, Martínez-Martínez L. OXA-207, a novel OXA-24 variant with reduced catalytic efficiency against carbapenems in *Acinetobacter pittii* from Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:4944-4948.

Centers for Diseases Control and Prevention - CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services. 2013.

Chagas TP, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79:468-72.

Chang H, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT e Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1632-1639.

Chatterjee S, Datta S, Roy S, Ramanan L, Saha A, Viswanathan R, Som T, Basu S. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. causing neonatal sepsis: focus on NDM-1 and its linkage to IS*Aba125*. *Front Microbiol*. 2016;7:1126.

Cheah S-E, Li J, Tsuji BT, Forrest A, Bulitta JB, Nation RL. Colistin and polymyxin B dosage regimens against *Acinetobacter baumannii*: differences in activity and the emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:3921-3933.

Chen TL, Lee YT, Kuo SC, Hsueh PR, Chang FY, Siu LK, Ko WC, Fung CP. Emergence and distribution of plasmids bearing the *bla*_{OXA-51-like} gene with an upstream IS*Aba1* in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:4575-81.

Chen TL, Lee Y T, Kuo S C, Yang S P, Fung C P, Lee S D. Rapid identification of *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii* with a multiplex PCR assay. J Med Microbiol. 2014;63:1154-9.

Cherkaoui A, Emonet S, Renzi G, Schrenzel J. Characteristics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Geneva during colonization or infection. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015;11:14–42.

Clímaco EC, Oliveira ML, Pitondo-Silva A, Oliveira MG, Medeiros M, Lincopan N, da Costa Darini AL. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. Infect Genet Evol. 2013;19:127-33.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S27. Wayne, PA: CLSI; 2017.

CVE - Centro de Controle de Vigilância Epidemiológica. 2016; <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/infeccao-hospitalar/sistema-de-vigilancia-epidemiologica> (acesso em 28/11/2016).

Cosgaya C, Marí-Almirall M, Van Assche A, Fernández-Orth D, Mosqueda N, Telli M, Huys G, Higgins PG, Seifert H, Lievens B, Roca I, Vila J. *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. Int J Syst Evol Microbiol. 2016; 66:4105-4111.

de Sá Cavalcanti FL, Mendes-Marques CL, Vasconcelos CR dos S, de Lima Campos T, Rezende AM, Xavier DE, Leal NC, de-Melo-Neto OP, de Moraes MM, Leal-Balbino TC. High frequency of OXA-253-Producing *Acinetobacter*

baumannii in different hospitals in Recife, Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2016;61:e01309-16.

de Sá Cavalcanti FL, Almeida AC, Vilela MA, de Moraes Junior MA, de Moraes MM, Leal-Balbino TC. Emergence of extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination? Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;77:250-1.

da Costa FR. Caracterização da presença de IS*Aba1* a montante do gene *oprD*-like em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenems. Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Mestre em Ciências. 2015.

Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS One. 2010;5:e10034.

Dijkshoorn L, Towner JK, Struelens M. New Approaches For The Generation And Analysis Of Microbial Typing Data. Edit. Elsevier. 2001.

Evans BA, Amyes SG. OXA β -lactamases. Clin Microbiol 2014. 27:241-63

Figueiredo S, Poirel L, Seifert H, Mugnier P, Benhamou D, Nordmann P. OXA-134, a naturally occurring carbapenem-hydrolyzing class D β -Lactamase from *Acinetobacter lwoffii*. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:5372-5375.

Figueiredo DQ, Santos KR, Pereira EM, Schuenck RP, Mendonça-Souza CR, Teixeira LM, Mondino SS. First report of the *bla*_{OXA-58} gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:368-70.

Finney M. Pulsed field gel electrophoresis. Current Protocol in Molecular Biology. Ed. Greene-Wiley, New York. 1993.

Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. Clin Infect. 2014;51:79-84.

Fonseca EL, Scheidegger E, Freitas FS, Cipriano R and Vicente ACP. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of *carO* alleles expression and *bla*_{OXA-23} gene. BMC Microbiol. 2013;13:245.

Fortaleza CMCB, Padoveze MC, Kiffer CRV, Barth AL, Carneiro ICDRS, Giamberardino HIG, Rodrigues JLN, Santos Filho L, de Mello MJG, Pereira MS, Gontijo Filho PP, Rocha M, Servolo de Medeiros EA, Pignatari ACC. Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. J Hosp Infect. 2017;96:139-144.

Fournier PE, Richet H e Weinstein RA. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin Infect Dis. 2006;42:692-699.

Fujikura Y, Yuki A, Hamamoto T, Kawana A, Ohkusu K, Matsumoto T. Blood stream infections caused by *Acinetobacter baumannii* group in Japan - Epidemiological and clinical investigation. J Infect Chemother. 2016;22:366-71.

Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:2070-2074.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN e Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 73:354-360.

Ghaith DM, Zafer MM, Al-Agamy MH, Alyamani EJ, Booq RY, Almoazzamy O. The emergence of a novel sequence type of MDR *Acinetobacter baumannii* from the intensive care unit of an Egyptian tertiary care hospital. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017;16:34.

Ghajavand H, Esfahani BN, Havaei SA, Moghim S, Fazeli H. Molecular identification of *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units and their antimicrobial resistance patterns. *Adv Biomed Res.* 2015;4:110.

Gionco B, Pelayo JS, Venancio EJ, Cayo R, Gales AC, Carrara-Marroni FE. Detection of OXA-231, a new variant of *bla*_{OXA-143}, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:2531–2532.

Girlich D., Damaceno QS, Oliveira AC, Nordmann P. OXA-253, a Variant of the Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:2976-8.

Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef AP, Asensi MD, Peixe L. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? J Antimicrob Chemother. 2011;66:62-5.

Gulen TA, Guner R, Celikbilek N, Keske S, Tasyaran M. Clinical importance and cost of bacteremia caused by nosocomial multi drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Infect. Dis. 2015;38:32-35.

Hamidian M, Nigro SJ, Hall R M. Problems with the Oxford Multilocus Sequence Typing scheme for *Acinetobacter baumannii*: do Sequence Type 92 (ST92) and ST109 exist? J Clin Microbiol. 2017;55:2287-2289.

Helfand MS, Bonomo RA. Beta-lactamases: a survey of protein diversity. Curr Drug Targets Infect Disord. 2003;3:9-23.

Héritier C, Poirel L, Lambert T, and Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:3198–3202

Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 2010;65:233-8.

Higgins PG, Lehmann M, e Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents. 2010;35:305.

Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:5035-5038

Horan TC, Andrus M, Dudeck M.A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control. 2008;36:309-32.

Hornstein M, Sautjeau-Rostoker C, Péduzzi J, Vessières A, Hong LT, Barthélémy M, Scavizzi M, Labia R. Oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase involved in resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett 1997;153:333–9.

Hu WS, Yao S-M, Fung C-P, Hsieh Y-P, Liu C-P, Lin J-F. An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii* . Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:3844-52.

Jeannot K, Diancourt L, Vaux S, Thouverez M, Ribeiro A, Coignard B, Courvalin P, Brisse S. Molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in France. PLoS One. 2014;9:e115452.

Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. J. Antimicrob. Chemother. 2011;66:1260–1262.

Karageorgopoulos DE e Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:751-762.

Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat.* 2012;15:237-47

Klevens MR, Edwards JR, Richards LC, Jr., Horan TC, Gaynes RP, Pollock DA, Cardo D. M. Estimating Health Care-Associated Infections and Deaths in U.S. Hospitals, 2002. *Public Health Rep.* 2007;122:160–166.

Kramer A, Schwebke I e Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2006;6:130.

La Scola B, Gundi VAKB, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol.* 2006;44:827-32.

Leão ACQ, Menezes PR, Oliveira MS, Levin AS. *Acinetobacter* spp. are associated with a higher mortality in intensive care patients with bacteremia: a survival analysis. *BMC Infect Dis.* 2016;16:386

Lee C-R, Lee JH, Park M, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:55.

Lee HY, Chang RC, Su LH. Wide spread of Tn2006 in an AbaR4-type resistance island among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 40:163–167

Lee HY, Huang CW, Chen CL, Wang YH., Chang CJ, e Chiu,CH. Emergence in Taiwan of novel imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST455 causing bloodstream infection in critical patients. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015a;48:588–596

Lee SY, Shin J H, Kim S H, Shin M G, Suh S P, Ryang D W. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based VITEK MS system for the identification of *Acinetobacter* species from blood cultures: comparison with VITEK 2 and MicroScan systems. *Ann Lab Med*. 2015b;35:62-8.

Lee YT, Kuo SC, Chiang MC, Yang SP, Chen CP, Chen TL, Fung CP. Emergence of carbapenem-resistant non-*baumannii* species of *Acinetobacter* harboring a *bla*_{OXA-51-like} gene that is intrinsic to *A. baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:1124-7.

Lee YT, Turton JF, Chen TL, Wu RC, Chang WC, Fung CP, Chen C.P, Cho WL, Huang LY, Siu LK First identification of *bla*_{OXA-51-like} in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. *J Chemother*. 2009;21:514-20.

Leite GC, Oliveira MS, Perdigão-Neto LV, Rocha CK, Guimarães T, Rizek C, Levin AS, Costa SF. Antimicrobial combinations against pan-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates with different resistance mechanisms. *PLoS One*. 2016;11:e0151270

Levin ASS, Mendez CMF, Sinto SI. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in São Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1996;17:366–368.

Lessel EF. International committee on nomenclature of bacteria subcommittee on the taxonomy of *Moraxella* and allied bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1971;21:213–214.

Li Y, Guo Q, Wang P, Zhu D, Ye X, Wu S, Wang M. Clonal dissemination of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing an OXA-23 β -lactamase at a teaching hospital in Shanghai, China. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015 Feb;48(1):101-8.

Liu D, Liu ZS, Hu P, Hui Q, Fu BQ, Lu SY, Li YS, Zou DY, Li ZH, Yan DM, Ding YX, Zhang YY, Zhou Y, Liu NN, Ren HL. Characterization of a highly virulent and antimicrobial-resistant *Acinetobacter baumannii* strain isolated from diseased chicks in China. *Microbiol Immunol*. 2016;60:533-9.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:268-81.

Mahamat A, Bertrand X, Moreau B, Hommel D, Couppie P, Simonnet C, Kallel H, Demar M, Djossou F, Nacher M. Clinical epidemiology and resistance mechanisms of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, French Guiana, 2008-2014. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48:51-5

Maragakis LL e Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance e treatment options. Clin Infect Dis. 2008; 46:1254-1263.

Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira CA, Carneiro I, Reis M, de Souza MA, Tranches R, Barata CU, Edmond MB; Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. J Clin Microbiol. 2011;49:1866–71

Martins AF e Barth AL. *Acinetobacter* multirresistente– um desafio para a saúde pública. Sci Med 2013; 23:56-62.

Martins N, Picão RC, Cerqueira-Alves M, Uehara A, Barbosa LC, Riley LW, Moreira BM. A new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clones. Infect Genet Evol. 2016;42:41-5.

Medeiros M e Lincopan N. Oxacillinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. J. Bras. Patol. Med. Lab. [online]. 2013;49:391-405

Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. J Antimicrob Chemother. 2009;63:55-9.

Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, Bou G. OXA-24 Carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-Like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 2724–2727.

Moreira MG, Camargo CH, Vasconcellos FM, Barreto LM, Nobre V, Santos SG. Diversity of *bla*_{OXA-51} variants and its clonal complexes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in patients with ventilator-associated pneumonia. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017;9:94-95.

Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39:396-401.

Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:35-40.

Narciso AC, Martins WMBS, Cayô R, de Matos AP, Santos SV, Ramos PL, da Cruz JB, Gales AC. Detection of OXA-58-producing *Acinetobacter seifertii* recovered from black-necked swan at a Zoo Lake. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61. pii: e01360-17

Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Brisse S, Higgins PG. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015; 65:934-42.

Ni W, Han Y, Zhao J, Wei C, Cui J et al. Tigecycline treatment experience against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;47:107–116.

Nigro SJ e Hall RM. Distribution of the *bla*_{OXA-23}-containing transposons Tn2006 and Tn2008 in Australian carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:2409-11.

Nigro SJ e Hall RM. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the OXA23 carbapenemase gene. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71: 1135-47.

Nowak J, Zander E., Stefanik D., Higgins P.G., Roca I., Vila J., McConnell M.J., Cisneros M.J. and H. Seifert H. High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72:3277-3282.

Organização Mundial de Saúde, acesso em 25/06/2017.
http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf

Pagano M, Martins AF e Barth AL. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Braz J Microbiol*. 2016;47:785-792.

Pagano M, Martins AF, Machado AB, Barin J, Barth AL. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the IS_{Aba1} upstream *bla*_{OXA-51-like} gene in Porto Alegre: southern Brazil. *Epidemiol Infect*. 2013;141:1–4.

Pagano M, Rocha L, Sampaio JL, Martins AF, Barth AL. Emergence of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* Belonging to High-Risk Clones (CC15 and CC79) in Different Brazilian States. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017;38:252-254

Pagano M, Rozales FP, Bertolini D, Rocha L, Sampaio JL, Barth AL e Martins AF. Emergence of *Acinetobacter baumannii* ST730 carrying the *bla*_{OXA-72} gene in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2016;111:597–598.

Park GE, Kang CI, Cha MK, Cho SY, Seok H, Lee JH, Kim JY, Ha YE, Chung DR, Peck KR, Lee NY, Song JH. Bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species with reduced susceptibility to tigecycline: clinical features and risk factors. *Int J Infect Dis*. 2017;62:26-31.

Paton R., Miles RS, Hood J, and Amyes SGB. ARI-1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 1993;2:81-88

Peleg AY, Paterson DL. Multidrug-resistant *Acinetobacter*: a threat to the antibiotic era. *Intern Med J*. 2006; 36:479-82.

Peleg AY, Seifert H e Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:538-582.

Pereira MS, Souza ACS, Tipple AFV, Pardo MA. A Infecção Hospitalar e suas implicações para o cuidar da enfermagem. *Texto Contexto Enferm*. 2005;14:250-7

Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA, Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51:3471–3484

Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld K-P, Seifert H, Witte W, Higgins PG. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:1998–2001.

Poirel L, Bonnin RA e Nordmann P. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *IUBMB Life*. 2011;63:1061-7.

Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1252–1256.

Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G and Nordmann P. OXA-58, a novel class D β -Lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 202–208.

Poirel L, Naas T e Nordmann P. Diversity, epidemiology e genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:24-38.

Poirel L e Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:826-836.

Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:119-23.

Portaria Nº 2616 , de 12 de maio de 1998. Ministério do Estado da Saúde.

Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45:568–585.

Pournaras S, Dafopoulou K, Del Franco M, Zarkotou O, Dimitroulia E, Protonotariou E, Poulou A, Zarrilli R, Tsakris A. Predominance of International Clone 2 OXA-23-producing-*Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece, 2015: results of a nationwide study. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49:749-753.

Pournaras S, Gogou V, Giannouli M, Dimitroulia E, Dafopoulou K, Tsakris A, Zarrilli R. Single-locus-sequence-based typing of *bla*_{OXA-51-like} genes for rapid assignment of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clonal lineages. *J Clin Microbiol*. 2014;5:1653-7.

Prado A, Arias NL, Chávez M, Cabrera CE, Gómez RF. Phenotypic characterization of *Acinetobacter baumannii* isolates in a high-complexity healthcare institution in the city of Cali. *Biomedica Suppl*. 2014;1:101-7.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:440-458.

Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis*. 2011;52:1138-1143.

Rossi F e Andreazzi DB. Resistência Bacteriana - Interpretado o antibiograma. Editora Atheneu, São Paulo, 34 – 35, 2005

Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Vila J, Pachón J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Bou G, Tomás M. Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:5247-57.

Saavedra SY, Cayô R, Gales AC, Leal AL, Saavedra CH. Early dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* strain in Colombia: a case report. Braz J Infect Dis. 2014;18:678-80.

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;5:200–14

Saranathan R, Sudhakar P, Karthika RU, Singh SK, Shashikala P, Kanungo R, Prashanth K. Multiple drug resistant carbapenemases producing *Acinetobacter baumannii* isolates harbours multiple R-plasmids. Indian J Med Res. 2014;140:262-70.

Schreckenberger PC e von Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium*, and other non-fermentative Gram-negative rods, p. 539-560. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1999.

Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn L. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2005;43:4328-35.

Sevillano E, Fernández E, Bustamante Z, Zabalaga S, Rosales I, Umaran A, Gallego L. Emergence and clonal dissemination of carbapenem-hydrolysing OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Bolivia. J Med Microbiol. 2012 ;61:80-4.

Silva RF. A infecção hospitalar no contexto das políticas relativas à saúde em Santa Catarina. Rev Latino-am Enfermagem 2003; 11:108-14.

Schimith Bier KE, Luiz SO, Scheffer MC, Gales AC, Paganini MC, Nascimento AJ, Carignano E e Dalla Costa LM. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. Am J Infect Control. 2010;38:308-314.

Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. Front Microbiol. 2015;6:242.

Smalla K, Jechalke S, Top EM. Plasmid detection, characterization and ecology. Microbiology spectrum. 2015;3:10.

Su CH, Wang JT, Hsiung, CA. Chien LJ, Chi CL, Yu HT, Chang FY e Chang SC. Increase of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in

acute care hospitals in Taiwan: association with hospital antimicrobial usage. PLoS One. 2012; 7:e37788.

Teixeira AB, Martins AF, Barin J, Hermes DM, Pormann C, Barth AL. Carbapenem-resistant *Acinetobacter nosocomialis* harboring IS*Aba1-bla*_{OXA-23} genes: first report in Latin America. J Clin Microbiol. 2013;51:2739-41.

Teixeira AB, Barin J, Hermes DM, Barth AL, Martins AF. PCR Assay Based on the *gyrB* Gene for Rapid Identification of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex at Specie Level. J Clin Lab Anal. 2017;31(3).

Tenover FC, Arbeit RD e Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol. 1997; 18:426-439.

Tien N, You B J, Chang H L, Lin H S, Lee, C Y, Chung T C, Lu J J, Chang C C. Comparison of Genospecies and Antimicrobial Resistance Profiles of Isolates in the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* Complex from Various Clinical Specimens. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56:6267–6271.

Tomaschek F, Higgins P G, Stefanik D, Wisplinghoff H, and Seifert H. Head-to-head comparison of two Multi-Locus Sequence Typing (MLST) schemes for characterization of *Acinetobacter baumannii* outbreak and sporadic isolates. PLoS One. 2016; 11: e0153014.

Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M, Group AS. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. Clin Microbiol Infect. 2008;14:161-167.

Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the *bla*_{OXA-51}-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. J. Clin. Microbiol. 2006; 44:2974-2976

Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2007;13:807-15.

Urban C, Segal-Maurer S, Rahal JJ. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Infect Dis. 2003;36:1268-74.

Vasconcellos FM, Tiba-Casas MR, Tavares LCB, Souza WV, Garcia DO, Camargo CH. Evaluation of a new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clonal complexes circulating in Brazil. Infect Genet Evol. 2017a;54:4-6.

Vasconcellos FM, Casas MR, Tavares LCB, Garcia DO, Camargo CH. In vitro activity of antimicrobial agents against multidrug- and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Med Microbiol. 2017b;66:98-102.

Vasconcelos AT, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucarevski BR, Cabral BG, Brasiliense DM, Rossi F, Furtado GH, Carneiro IC, da Silva JO, Ribeiro J, Lima KV, Correa L, Britto MH, Silva MT, da Conceição ML, Moreira

M., Martino M. D., de Freitas M. R., Oliveira M. S., Dalben M. F., Guzman RD, Cayô R., Moraes R., Santos S. A., Martins W. M. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;4:382-5.

Vega S e Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among Gram-positive and Gram-negative organisms collected from the Latin American region between 2004 and 2015 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;16:50.

Vila J, Navia M, Ruiz J, Casals C. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:2757-2759.

Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Vindel A, Saez-Nieto JA. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- β -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:550-3.

Wang P, Bowler SL, Kantz SF, Mettus RT, Guo Y, McElheny CL, Doi Y. Comparison of Minocycline Susceptibility Testing Methods for Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2016;54:2937-2941.

Wareham DW, Bean DC, Khanna P, Hennessy EM, Krahe D, Ely A e Millar M. Bloodstream infection due to *Acinetobacter* spp: epidemiology, risk factors and impact of multi-drug resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27:607-612.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991;173:697-703.

Werneck JS, Picão RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother.* 2011a;66:452-454.

Werneck JS, Picão RC, Girardello R, Cayô R, Marguti V, Dalla-Costa L e Gales AC. Low prevalence of *bla*_{OXA-143} in private hospitals in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011b; 55: 4494–4495.

Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, Stefanik D, Higgins PG, Edmond MB, Wenzel RP, Seifert H. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *J Infect.* 2012;64:282-90.

Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG e Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 27:351-353.

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35:736-55.

Wong YP, Chua KH, Thong KL. One-step species-specific high resolution melting analysis for nosocomial bacteria detection. *J Microbiol Methods.* 2014;107:133-7.

Wu W, He Y, Lu J, Lu Y, Wu J, Liu Y. Transition of *bla*_{OXA-58}-like to *bla*_{OXA-23}-like in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates in Southern China: An 8-Year Study. PLoS One. 2015;10:e0137174.

Zander E, Bonnin RA, Seifert H, Higgins PG. Characterization of *bla*_{OXA-143} variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. Antimicrob. Agents Chemother. 2014;58: 2704-2708

Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. Int J Antimicrob Agents. 2013;41:11-9.

ANEXOS

Anexo A- Relação de cepas a serem estudadas

Número	Ano	Material	Amostra	Clínica	Multirresistente
1	2007	Secreção Traqueal	S-6730/07	UTI Central	Sim
2	2007	Ponta de catéter	S-3570/07	UTI Pediatria	Sim
3	2007	Sangue	S-5467/07	UTI Central	Sim
4	2008	Sangue	H-459/08	UTI Central	Sim
5	2008	Sangue	H-828/08	Ambulatório	Sim
6	2008	Sangue	H-888-901/08	Gastro-cirurgia	Sim
7	2008	Sangue	H-1154-55/08	UTI Pronto-socorro	Sim
8	2008	Sangue	H-1945/08	Pronto socorro	Sim
9	2008	Sangue	H-4029-30/08	Pronto-socorro	Sim
10	2008	Ponta de catéter	H-4716/08	Pronto-socorro	Sim
11	2008	Ponta de catéter	H-5286/08	Cirurgia Cardíaca	Sim
12	2008	Ponta de catéter	H-5470/08	Gastro-cirurgia	Sim
13	2009	Ponta de catéter	S-382/09	Clínica Médica	Sim
14	2009	Sangue	H-566/09	Pronto-socorro	Sim
15	2009	Sangue	H-589/09	Ortopedia	Sim
16	2009	Sangue	H-760/09	Neurologia	Sim
17	2009	Sangue	H-1695/09	Hematologia	Sim
18	2009	Sangue	H-2746/09	Sorocabano	Sim
19	2010	Sangue	H-509-10/10	Nefrologia	Sim
20	2010	Sangue	H-3566-7/10	Pronto-socorro	Sim
21	2010	Sangue	H-5222-3/10	Pronto-socorro	Sim
22	2010	Sangue	H-5834-5/10	Gastro-cirurgia	Sim
23	2010	Sangue	H-7060/10	Pneumologia	Sim
24	2011	Sangue	H-102/11	UTI Central	Sim
25	2011	Sangue	H-745/801/11	Pediatria	Sim
26	2011	Sangue	H-991-1/11	Cardiologia Clínica	Sim
27	2011	Sangue	H-1406/11	UTI Pronto-socorro	Sim
28	2011	Sangue	H-2041/11	UTI Central	Sim
29	2011	Sangue	H-2061-1,2/11	UTI Berçário	Sim
30	2011	Sangue	H-2356-7/11	Gastro cirurgia	Sim
31	2010	Sangue	H-2456-57/10	Pediatria	Sim
32	2011	Sangue	H-2971/11	Hematologia	Sim
33	2011	Sangue	H-3238/11	UTI Central	Sim
34	2011	Sangue	H-3701-2/11	UTI Central	Sim
35	2011	Sangue	H-3799/11	Nefrologia	Sim
36	2011	Sangue	H-4302-3,4/11	UTI Central	Sim
37	2011	Sangue	H-4496-97/11	UTI Central	Sim
38	2011	Sangue	H-4689-90/11	Clínica Médica	Sim
39	2011	Sangue	H-4762/11	Neurologia	Sim
40	2011	Sangue	H-4888-89/11	UTI Central	Sim
41	2011	Sangue	H-5050/11	Gastro clínica	Sim
42	2011	Sangue	H-5430-31/11	UTI Central	Sim
43	2011	Sangue	H-6401-00/11	UTI Central	Sim

44	2011	Sangue	H-6777/11	UTI Central	Sim
45	2011	Sangue	H-6950/11	UTI Central	Sim
46	2011	Sangue	H-7545/11	Hematologia	Sim
47	2011	Sangue	H-7635/11	Nefrologia	Sim
48	2012	Sangue	H-3609/12	Cirurgia Cardíaca	Sim
49	2012	Sangue	H-3804-5/12	Gastro cirurgia	Sim
50	2012	Sangue	H-8343/12	Clínica Médica	Sim
51	2012	Sangue	H-98296/12	UTI	Sim
52	2012	Sangue	H-110806/12	UTI Adulto	Sim
53	2012	Sangue	H-137737/12	Pronto-socorro	Sim
54	2012	Sangue	H-138356/12	UTI Pediátrica	Sim
55	2012	Sangue	H-147465/12	UTI Pronto-socorro	Sim
56	2012	Sangue	H-146066/12	UTI Pronto-socorro	Sim
57	2012	Sangue	H-187502/12	UTI Pronto-socorro	Sim
58	2012	Sangue	H-219030/12	UTI Pronto-socorro	Sim
59	2012	Sangue	H-185152/12	UTI Pronto-socorro	Sim
60	2013	Sangue	H-245635/13	Moléstias infecciosas	Sim
61	2013	Sangue	H-249348/13	Clínica Médica	Sim
62	2013	Sangue	H-253169/13	Pediatria	Sim
63	2013	Sangue	H-253304/13	Gastro cirurgia	Sim
64	2013	Sangue	H-256243/13	UTI Pronto-socorro	Sim
65	2013	Sangue	H-257146/13	UTI Pronto-socorro	Sim
66	2013	Sangue	H-273386/13	Gastro cirurgia	Sim
67	2013	Sangue	H-280160/13	Clínica Médica	Sim
68	2013	Sangue	H-302383/13	Neurologia	Sim
69	2013	Sangue	H-310251/13	Clínica Médica	Sim
70	2013	Sangue	H-323515/13	Gastro cirurgia	Sim
71	2013	Sangue	H-340287/13	Pronto-socorro	Sim
72	2013	Sangue	H-341258/13	UTI Pronto-socorro	Sim
73	2013	Sangue	H-353581/13	Pediatria	Sim
74	2013	Sangue	H-357898/13	Clínica Médica	Sim
75	2013	Sangue	H-370308/13	Clínica Médica	Sim
76	2013	Sangue	H-393534/13	UTI Pronto-socorro	Sim
77	2013	Sangue	H-418977/13	Clínica Médica	Sim
78	2013	Sangue	H-429865/13	UTI Adulto	Sim
79	2013	Sangue	H-458368/13	Clínica Médica	Sim
80	2013	Sangue	H-447613/13	UTI Neonatal	Sim
81	2013	Sangue	H-477334/13	Clínica Médica	Sim
82	2013	Sangue	L-401956/13	UTI Pronto-socorro	Sim
83	2013	Sangue	H-495148/13	UTI Pronto-socorro	Sim
84	2013	Sangue	H-502413/13	UTI Pronto-socorro	Sim
85	2013	Sangue	H-543336/13	Pediatria	Sim
86	2013	Sangue	H-558912/13	UTI Pronto-socorro	Sim
87	2013	Sangue	H-569263/13	UTI Pronto-socorro	Sim
88	2013	Sangue	H-587201/13	Não informado	Sim
89	2013	Sangue	H-591809/13	Não informado	Sim
90	2013	Sangue	H-606785/13	Clínica Médica	Sim
91	2013	Sangue	H-594593/13	Não informado	Sim
92	2013	Sangue	H-596674/13	UTI Pronto-socorro	Sim

93	2014	Sangue	H-652230/14	Clínica Médica	Sim
94	2014	Sangue	H-652238/14	Clínica Médica	Sim
95	2014	Sangue	H-658011/14	Clínica Médica	Sim
96	2014	Sangue	H-660079/14	Clínica Médica	Sim
97	2014	Sangue	H-661487/14	Clínica Médica	Sim
98	2014	Sangue	H-672164/14	UTI Pronto-socorro	Sim
99	2014	Sangue	H-673893/14	Ginecologia	Sim
100	2014	Sangue	H-688086/14	Cirurgia Vascular	Sim
101	2014	Sangue	H-688286/14	Ginecologia	Sim
102	2014	Sangue	H-706108/14	Clínica Médica	Sim
103	2014	Sangue	H-706727/14	UTI Pronto-socorro	Sim
104	2014	Sangue	H-712912/14	UTI Pronto-socorro	Sim
105	2014	Sangue	H-716451/14	UTI Pronto-socorro	Sim
106	2014	Sangue	H-731723/14	UTI Pronto-socorro	Sim
107	2014	Sangue	H-756010/14	Não informado	Sim
108	2014	Sangue	H-749965/14	Não informado	Sim
109	2014	Sangue	H-736850/14	Não informado	Sim
110	2014	Sangue	H-737599/14	UTI Pronto-socorro	Sim
111	2014	Sangue	H-760326/14	UTI Pediátrica	Sim
112	2014	Sangue	H-764404/14	Não informado	Sim
113	2014	Sangue	H-774519/14	Neurologia	Sim
114	2014	Sangue	H-767945/14	Urologia	Sim
115	2014	Sangue	H-766868/14	UTI Pronto-socorro	Sim
116	2014	Sangue	H-782338/14	UTI Pronto-socorro	Sim
117	2014	Sangue	H-785795/14	UTI Pediátrica	Sim
118	2014	Sangue	H-784134/14	Pronto-socorro	Sim
119	2014	Sangue	H-792533/14	Neurologia	Sim
120	2014	Sangue	H-793890/14	Clínica Médica	Sim
121	2014	Sangue	H-795484/14	Pediatria	Sim
122	2014	Sangue	H-836828/14	Pronto-socorro	Sim
123	2014	Sangue	H-852238/14	Clínica Médica	Sim
124	2014	Sangue	H-853845/14	PS	Sim
125	2014	Sangue	H-858434/14	Pediatria	Sim
126	2014	Sangue	H-860486/14	Pediatria	Sim
127	2014	Sangue	H-900139/14	Pediatria	Sim
128	2014	Sangue	H-723729/14	Não informado	Sim
129	2014	Sangue	H-933478/14	UTI Pronto-socorro	Sim
130	2014	Sangue	H-955442/14	UTI Pronto-socorro	Sim
131	2009	Sangue	H-2864/09	Gastro cirurgia	Sim
132	2009	Sangue	H-234-35/09	Neurologia	Sim
133	2009	Sangue	H-688-89/09	Neurologia	Sim
134	2009	Sangue	H-723-24/09	Neurocirurgia	Sim