

Daniela Cristina Tartari

**RASTREIO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
GENÉTICA DE *Acinetobacter* spp. ISOLADOS DE AMBIENTE
HOSPITALAR**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-graduação
em Farmácia da Universidade
Federal de Santa Catarina para
a obtenção do Grau de mestre
em Farmácia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thaís
Cristine Marques Sincero

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Tartari, Daniela Cristina

Rastreamento, identificação e caracterização de *Acinetobacter* spp. isolados de ambiente hospitalar / Daniela Cristina Tartari ; orientadora, Thais Cristine Marques Sincero - Florianópolis, SC, 2016.
130 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Acinetobacter* spp.. 3. IRAS. 4. qPCR, Rep-PCR. 5. Blue-Carba. I. Marques Sincero, Thais Cristine. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

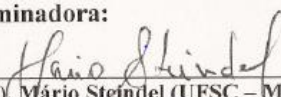
**“RASTREIO, IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE Acinetobacter
spp. ISOLADOS DE AMBIENTE HOSPITALAR”**

POR

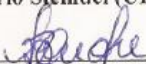
Daniela Cristina Tartari

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

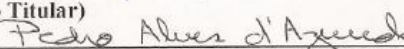
Banca Examinadora:




Prof(a). Dr(a). Mário Steindel (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Fabiana Botelho de Miranda Onofre (UFSC –
Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Pedro Alves d'Azevedo (UECSPA - Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Thais Cristine Marques Sincero (UFSC –
Orientador(a))

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 22 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais que me deram todo o amparo necessário e por pensarem sempre em me proporcionar uma excelente educação, desde o colégio até a faculdade. Tenham certeza que as dificuldades para que isso acontecesse valeram a pena e foram muito importantes para mim.

Ao Alex, meu namorado, amigo e companheiro, sem você eu não teria chegado tão longe e não estaria cursando o mestrado. Obrigada por me apoiar e aguentar esse final conturbado. Sem seus mimos, comidas e todo carinho durante essa etapa nada seria possível. Meus dias são mais felizes por saber que tenho você ao meu lado. Obrigada por dividir sua vida comigo!

À professora Thaís pela oportunidade e por me aceitar como sua aluna mesmo sem me conhecer. Sua sabedoria e calma em lidar com diversas situações são de encher os olhos de admiração. Obrigada pela parceria, amizade e exemplo de profissionalismo.

Às suricatis, meus dias são mais felizes por saber que posso falar com vocês sempre e a qualquer hora. A alegria de saber que posso contar com cada uma de vocês é confortante, amigas de uma vida inteira que jamais sairão do meu coração.

À Mazi, não tenho palavras para expressar tudo que eu deveria te falar. Inimaginável que estaríamos novamente na mesma cidade, obrigada pela amizade, pelos melhores cinco anos, por tudo desde sempre. Obrigada pela correção!

À Ana, encontro que infelizmente demorou em acontecer, mas, quando aconteceu, foram os melhores cinco anos. Obrigada por ser você, por estar por perto, pela parceria e por me inspirar em fazer atividade física!

À Clarice, pela amizade e por ser essa pessoa encantadora, sem ter alguém no mesmo barco seria mais difícil. Obrigada pela amizade e pelas conversas na madrugada.

À Caetana, por me aguentar nesse final de mestrado me dando todo o apoio e ajuda, ter alguém para conversar foi muito importante.

Às meninas do laboratório MIMA por todo o apoio, mensagens de carinho e torcida.

À querida Aline, pelos ensinamentos passados, pela paciência em ensinar e por todo o apoio nas coletas tão desgastantes.

À Patrícia, pelos ensinamentos compartilhados, pela parceria nas coletas, pela amizade e toda a ajuda durante esse último ano.

À equipe da Neoprospecta pela experiência adquirida e por possibilitar a realização deste projeto.

Ao laboratório LBMM e Protozoologia pela utilização dos equipamentos.

À UFSC, PGFAR, CAPES e Neoprospecta por possibilitar a realização deste projeto.

Curva e tropeço

Não há vida
sem curva
É preciso sair da linha
do eixo

Se faz fundamental o tombo
Ajuda a desenhar ondas de vida

emoções
erros
acertos
encontros
beijos
e adeus
inícios meios fins
sempre recomeço

O segredo e a beleza de tudo
no tropeço.

(Janaína Moitinho)

RESUMO

Acinetobacter spp., especialmente *A. baumannii* é um patógeno oportunista que causa infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no mundo todo, com alta morbidade e mortalidade. Infecções causadas por *A. baumannii* multidroga resistente (MDR) têm aumentado e preocupado os hospitais na escolha da terapia adequada para esses pacientes. O mecanismo mais comum de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* é a degradação enzimática por carbapenemases, como as Beta-lactamases da classe A, Metallo-Beta-lactamase (MBL) e oxacilinases. Neste estudo foram identificados e caracterizados *Acinetobacter* spp. de um Hospital Universitário (HU-UFSC, Florianópolis/SC, Brasil), isolados entre março e setembro de 2015, coletados de profissionais da saúde, pacientes e superfícies de alto contato de cinco alas do hospital: emergência (EMG), Unidade de terapia intensiva (UTI), Centro cirúrgico (CC), Clínica cirúrgica (CR1) e Clínica médica I (CMI). A identificação e o TSA (Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos) foram determinados pelo sistema automatizado (Vitek2[®]; bioMérieux). Espécies foram também identificadas por sequenciamento do 16S rDNA. A presença de 17 genes foi detectada por qPCR: *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-72-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES}, *bla*_{CTXM-1}, *bla*_{CTXM-2}, *bla*_{CTXM-8}, *bla*_{CTXM-9}. Das 1.430 amostras coletadas, obtivemos 575 isolados, dessas, 140 eram *Acinetobacter* spp. e 70,7% eram MDR (com 96,9% de resistência aos carbapenêmicos). A detecção dos genes de resistência mostrou que 73,5% das amostras foram positivas para OXA-23, 77,8% para OXA-51 e 2,1% para SHV e CTXM-8. Alguns isolados de *Acinetobacter* spp. com genes de resistência foram encontrados nas salas de lanches, passante, sala de repouso da enfermagem e nas mãos dos profissionais da saúde. Curiosamente, foram encontrados isolados sensíveis aos carbapenêmicos, mas com genes de resistência para carbapenemases (OXA-23). O teste rápido Blue-Carba, que detecta bactérias produtoras de carbapenemases, mostrou 100% de sensibilidade e especificidade quando comparado ao qPCR. Através do Rep-PCR, 23 perfis diferentes de bandas foram encontrados, quatro desses constituídos exclusivamente por isolados resistentes aos carbapenêmicos, tendo um perfil prevalente com 58 dos isolados (41%). A porcentagem de

similaridade global dos 23 perfis foi de 70%. Esses resultados evidenciam alguns pontos críticos no hospital e mostram que uma detecção rápida das bactérias, com genes de resistência circulantes e dos perfis genéticos existentes no hospital, podem orientar condutas para a redução das taxas de IRAs.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* spp. Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), multidroga resistência (MDR), genes de resistência, qPCR, Rep-PCR, Blue-Carba.

SCREENING, IDENTIFICATION AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *Acinetobacter* spp. FROM HOSPITAL SAMPLES

ABSTRACT

Acinetobacter spp., particularly *A. baumannii*, is an opportunistic pathogen that causes healthcare-associated infections (HAI) worldwide with high morbidity and mortality. Infections by *A. baumannii* multidrug-resistant (MDR) have increased and worried hospital institutions to figure out the appropriate treatment for these patients. The most common mechanism of resistance to carbapenems in *A. baumannii* is enzymatic degradation by carbapenemases, such as Class A Beta-lactamases, Metallo-Beta-lactamase (MBL) and Oxacilinases. In this study, we identified and characterized *Acinetobacter* spp. from a University Hospital (HU-UFSC, Florianópolis/SC, Brazil) isolated in Mar-Sep-2015, from healthcare workers, patients and high-touch surfaces at 5 hospital units: Emergency (EMG), Intensive Care (ICU), Surgical Center (SC), Surgical Inpatient (SIU) and Medical Inpatient (MIU). The identification and the AST (antimicrobial susceptibility test) were determined by an automated method (Vitek2[®]; bioMérieux). Species were also identified by 16S rDNA sequencing. The presence of 17 resistance genes was tested by qPCR: *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-72-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES}, *bla*_{CTXM-1}, *bla*_{CTXM-2}, *bla*_{CTXM-8}, *bla*_{CTXM-9}. From the 1,430 samples collected, we obtained 575 strains, out of these, 140 were *Acinetobacter* spp. and 70.7% were MDR (being 96.9% of these resistant to carbapenems). The detection of resistance genes showed that 73.5% of strains were positive for OXA-23, 77.8% for OXA-51 e 2.1% para SHV e CTXM-8. Some of *A. baumannii* with resistance genes were found in the snack room, on a patient bed transfer board, nurse's station and hands of healthcare workers. Interestingly, we found *Acinetobacter* spp. sensitive to carbapenems with carbapenem resistance genes (OXA-23). The rapid test Blue-Carba, which detects strains producing carbapenemases, showed 100% of sensitivity and specificity comparing to qPCR. Rep-PCR revealed 23 different profiles (four composed of strains resistant to carbapenems), being one prevalent with 58 isolates (41%). The global percentage of similarity of these profiles was of 70%. These

results highlight some critical points found in the hospital and show that a rapid detection of strains with resistance genes and the genetic profiles circulating in the hospital, may contribute in the conduits for the reduction of hospital infection.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* spp. healthcare-associated infections (HAI), multidrug-resistant (MDR), resistance genes, qPCR, Rep-PCR, Blue-Carba.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Epidemiologia global de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos.....	36
Figura 2: Bombas de efluxo.....	39
Figura 3: Processamento das amostras coletadas no Hospital.....	59
Figura 4: Processamento das amostras para identificação e avaliação da suscetibilidade no Vitek2 [®] BioMérieux.....	61
Figura 5: Resultados representativos do teste Blue-Carba.....	67
Figura 6: Prevalência dos tipos de genes de resistência encontradas neste estudo.....	89
Figura 7: Teste Blue-Carba para detecção fenotípica de carbapenemases.....	91
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1,5% representativo da Rep-PCR realizada para tipagem dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp.....	94
Figura 9: Dendograma obtido após Rep-PCR de 127 isolados de de <i>Acinetobacter</i> spp., mostrando 23 perfis encontrados.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Pontos e sítios de coleta; e quantidade de amostras mensal e total coletadas entre março-outubro de 2015 no HU-UFSC, no âmbito do projeto HAIMP.....	58
Quadro 2: Identificação das 131 espécies pelo Vitek2 [®] e pelo sequenciamento do 16S rDNA.....	75
Quadro 3: Distribuição espacial e temporal dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. no HU-UFSC.....	77
Quadro 4: Perfil fenotípico das 40 amostras testadas com os genes de resistência respectivos, relacionando com a resistência aos carbapenêmicos de cada isolado e o resultado do teste Blue-Carba.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critério de interpretação dos padrões de PFGE segundo (TENOVER <i>et al.</i> , 1995).....	70
Tabela 2: Fenótipos obtidos avaliando-se os perfis de resistência aos antimicrobianos dos 140 isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. e número de isolados de cada gene de resistência para cada fenótipo. O fenótipo 1 foi utilizado como referência por ser o mais abundante.....	81
Tabela 3: Perfis gerados através do Rep-PCR dos 97 isolados resistentes aos carbapenêmicos e locais onde foram isolados.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC-ATP - Binding Cassette Superfamily (Superfamília de Cassetes de ligação de ATP)
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (National Health Surveillance Agency)
- BHI - Brain-Heart-Infusion (Infusão de cérebro e coração)
- CC - Centro cirúrgico (Surgical Center)
- CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (Hospital Infection Control Commission)
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
- CHDLs - Carbapenem- Hydrolyzing Class D Beta-Lactamase (Oxacilinases hidrolisantes de carbapenêmicos, Beta-lactamases de classe D)
- CIM - Concentração Inibitória Mínima (Minimum inhibitory concentration – MIC)
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas)
- CMI - Clínica médica I (Medical Inpatient I)
- Cq - Ciclo de quantificação (Cycle quantification)
- CRI - Clínica cirurgia I (Surgical Inpatient I)
- ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control (Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças)
- EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido Etilenodiamino tetra-acético)
- EMG - Emergência (Emergency)
- HAIMP - Healthcare Associated infections Microbiome Project (Projeto Microbioma de Infecções Associadas à Assistência à Saúde)
- HU/UFSC - Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (University Hospital Polydoro Ernani de São Thiago)
- IRAS - Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (Healthcare-associated infection)
- IS - Insertion Sequence (Sequência de inserção)
- KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
- MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz)
- MATE - Multidrug and Toxic-compound Extrusion Family (Família de extrusão de compostos tóxicos e multidrogas)
- MBL - Metallo-Beta-lactamase (Metallo-Beta-lactamase)

MDR - Multidroga resistente (Multidrug resistant)
MFS - Major Facilitator Superfamily (Superfamília de facilitadores principais)
MLST - Multilocus sequence typing (Tipagem por Sequenciamento de Multilocus)
NCBI - National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
NDM - New Delhi Metallo Beta-lactamase (Metallo Beta-lactamase de Nova Deli)
NGS - Next Generation Sequencing (Sequenciamento de Nova Geração)
OMP - (Outer membrane protein) Proteínas da membrana externa
OMS - Organização Mundial da Saúde (World Health Organization – WHO)
OXA - Oxacilinases (Oxacillinases)
PCIH - Programa de Controle de Infecção Hospitalar (Hospital Infection Control Program)
PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PDR - Pandrug Resistance (Pan-droga resistente)
PFGE - Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Eletroforese em gel de Campo Pulsado)
qPCR - Quantitative PCR (PCR quantitativa)
RAPD-PCR - Random amplified polymorphic DNA-PCR (Amplificação randômica do DNA polimórfico)
REP-PCR - Repetitive element palindromic PCR (PCR do Elemento repetitive palindrômico)
RND - Resistance-Nodulation-Division Family (Família Resistência-Nodulação-Divisão Celular)
SMR - Small Multidrug Resistance Family (Família de baixa resistência a multidrogas)
TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido (The written informed consent form (WICF))
TSA - Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (Antimicrobial Susceptibility Testing)
UTI - Unidade de terapia intensiva (Intensive Care)
XDR - Extensively Drug Resistant (Extensivamente Resistente a Medicamentos)

SUMÁRIO

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</u>	23
<u>2</u>	<u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	29
2.1	INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE- IRAS	29
2.2	MULTIDROGA-RESISTÊNCIA (MDR- MULTI-DRUG-RESISTANT)	31
2.3	<i>ACINETOBACTER SPP.</i> MULTIDROGA-RESISTENTE (MDR)	32
2.4	PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM <i>ACINETOBACTER SPP.</i>	36
2.4.1	REDUÇÃO NA EXPRESSÃO DE PORINAS	37
2.4.2	SUPEREXPRESSÃO DE BOMBAS DE EFLUXO	38
2.4.3	METALLO-BETA-LACTAMASES, CLASSE B (MBL)	41
2.4.4	OXACILLINASES HIDROLISANTES DE CARBAPENÊMICOS, BETA-LACTAMASES DE CLASSE D (CHDLs)	43
2.5	MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES	45
2.6	MÉTODOS PARA ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA	49
2.7	OBJETIVO GERAL	53
2.8	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
<u>3</u>	<u>METODOLOGIA</u>	55
3.1	BACTÉRIAS ISOLADAS	55
3.1.1	PROJETO HAIMP	55
3.1.2	COLETA DAS AMOSTRAS	56
3.1.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	59
3.2	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	60
3.2.1	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS	60
3.2.2	IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS	61
3.3	TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)	64
3.4	AMPLIFICAÇÃO DOS GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS	65
3.4.1	AMPLIFICAÇÃO GÊNICA POR PCR	65

3.5 AVALIAÇÃO DO TESTE BLUE-CARBA PARA DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES	66
3.6 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO CLONAL DOS ISOLADOS POR REP-PCR	67
3.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA	67
3.6.2 REP-PCR	68
3.7 RESULTADOS REPORTADOS PARA O HOSPITAL	70
<u>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>73</u>
4.1 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DAS ESPÉCIES	73
4.2 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL DOS ISOLADOS	76
4.3 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	79
4.4 GENES DE RESISTÊNCIA	86
4.5 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES	89
4.6 VARIABILIDADE GENÉTICA	93
4.7 FEEDBACK DOS RESULTADOS PARA O HOSPITAL	99
<u>5 CONCLUSÕES</u>	<u>103</u>
<u>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	<u>105</u>
<u>7 PERSPECTIVAS</u>	<u>107</u>
REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são consideradas o evento adverso mais comum das hospitalizações e têm ameaçado a segurança dos pacientes em todo o mundo (ALLEGIANZI *et al.*, 2011). As IRAS apresentam um grande impacto sobre a morbidade e mortalidade, duração da internação e custos hospitalares (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

Dentre as infecções causadas por bactérias Gram-negativas associadas à assistência à saúde, os patógenos mais comuns e preocupantes são as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Acinetobacter* spp. O tratamento de infecções causadas por essas bactérias tem aumentado e é um desafio comum na maioria dos hospitais (CDC., 2013).

Acinetobacter baumannii é um patógeno oportunista mais importante entre os *Acinetobacter* spp., inicialmente considerado de baixo potencial patogênico em indivíduos saudáveis, mas que causa infecções nosocomiais associados com pacientes imunocomprometidos e apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade (ABBOTT *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2013). Desse modo, tem emergido como um dos patógenos mais preocupantes relacionados com as IRAS e tem demonstrado uma notável capacidade de adquirir resistência, fazendo com que seja um dos microrganismos que mais ameaçam a era antibiótica atual (PELEG *et al.*, 2008).

A resistência a múltiplos fármacos pelos isolados de *A. baumannii* tem aumentado nos últimos tempos e tem preocupado as instituições hospitalares no tratamento adequado para essas infecções (KUO *et al.*, 2014). *A. baumannii* têm a capacidade de sobreviver em superfícies úmidas e secas e podem estar presentes nos gêneros alimentícios e em pele saudável.

É considerado como uma das maiores causas de septicemia, pneumonias associadas ou não à ventilação mecânica, infecções de feridas e infecções urinárias após a internação de pacientes com doenças graves e/ou com o sistema imune comprometido (KUO *et al.*, 2010; PASANEN *et al.*, 2014).

Isolados multirresistentes estão sendo cada vez mais relatados durante a última década, provavelmente como consequência do uso extensivo de agentes antimicrobianos (POIREL; NORDMANN, 2006).

Os antimicrobianos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e doripenem) são considerados os agentes de escolha para infecções por *A. baumannii*. A presença de resistência a esses agentes restringe as opções terapêuticas. Portanto, a terapia combinada tem sido citada como melhor opção, como a associação com colistina, de preferência junto com um carbapenêmico, podendo ser mais eficaz do que a colistina sozinha (ABBOTT *et al.*, 2013).

Isolados multirresistentes de *A. baumannii* têm surgido nas últimas décadas, como resultado da combinação de dois fatores principais: primeiro, devido a um elevado grau de plasticidade genômica e, segundo, a mutação de genes endógenos, que está associada à resistência antimicrobiana, tais como superexpressão de Beta-lactamases (como AmpC e OXA-51-like), a redução na expressão de porinas (CarO e Omp33), a mutação nos genes *gyrA* e *parC* e a superexpressão de sistemas de efluxo (RUMBO *et al.*, 2013).

O mecanismo mais comum de resistência aos carbapenêmicos é a degradação enzimática por carbapenemases, especialmente as metalo-Beta-lactamases (MBL) da classe B de Ambler e as oxacilinases (OXA) da classe D (ABBOTT *et al.*, 2013). A propagação clonal de carbapenemases do tipo OXA tem ocorrido dentro de vários hospitais, enquanto que a disseminação inter-hospitalar de *A. baumannii*, que carregam os genes OXA, também tem sido observada em vários países (KUO *et al.*, 2010).

Dentre as MBL, destacam-se as enzimas do tipo IMP, VIM e SIM, pertencentes à classe 1 dos integrons e NDM-1 e 2, relacionadas principalmente com transposons (Tn125), suportadas por duas cópias da sequência de inserção ISAb125, e não relacionada com plasmídios (POIREL *et al.*, 2012).

No grupo das oxacilinases da classe D, destacam-se enzimas do grupo OXA-23 (OXA-23, -27 e -49) que são

encontradas tanto no cromossomo como em plasmídios, em associação com a inserção ISAb₁ dentro dos transposons Tn2006 e Tn2008 ou com ISAb₄ em Tn2007 (HERITIER *et al.*, 2006). O grupo OXA-24/40 (OXA-25, -26, -40 e -72), que possui resistência adquirida cromossômica ou plasmidial, não é associado a sequências de inserção; enzimas do tipo OXA-58 são encontradas, principalmente, em plasmídios associados com as sequências de inserção ISAb₁, ISAb₃ e IS18 (PELEG *et al.*, 2008). O grupo OXA-51 (OXA-51, -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80, -82 e -143), de localização cromossômica e/ou plasmidial, confere resistência quando a sequência de inserção ISAb₁ é inserida à montante (5') do gene (PAGANO *et al.*, 2013). Claramente, a transposição da sequência de inserção pode desempenhar um papel importante no aumento da disseminação de resistência e nos traços de virulência (KUO *et al.*, 2014).

A resistência via superexpressão de bombas de efluxo pode ser mediada por proteínas de cinco famílias que estão associadas com a resistência a múltiplos fármacos em organismos Gram-positivos e Gram-negativos: a superfamília ABC (ATP-binding Cassette Superfamily), a superfamília MFS (Major Facilitator Superfamily), a família MATE (Multidrug and Toxic-compound Extrusion Family), a família SMR (Small Multidrug Resistance Family) e a família RND (Resistance Nodulation Division) (ABBOTT *et al.*, 2013). Dentre essas famílias, existem três sistemas RND (AdeABC, AdeJK e AdeFGH) que têm sido caracterizados e relatados como responsáveis pela multidroga resistência (MDR) em *A. baumannii*.

A. baumannii tem intrinsecamente um menor número e tamanho de porinas em comparação com outros organismos Gram-negativos, o que contribui para a impermeabilidade da membrana externa. Três porinas foram implicadas na resistência aos carbapenêmicos quando a sua expressão é reduzida; CarO, Omp 33-36 e OprD. Vale destacar que CarO (proteína de 29 KDa) é a porina mais caracterizada (ABBOTT *et al.*, 2013).

A. baumannii pode alterar rapidamente seu genoma para escapar dos mecanismos naturais de defesa do hospedeiro e da intervenção dos antimicrobianos. A recombinação do genoma promove a diversificação dos isolados nas epidemias, resultando em surtos policlonais (KUO *et al.*, 2014).

Esses fatores, juntamente com a resistência aos antimicrobianos, tanto intrínseca como adquirida, representam o sucesso de *A. baumannii* como uma importante causa de surtos e disseminação endêmica de clones resistentes em todo o mundo. Alto custo, morbidade e mortalidade têm sido relatados nos surtos e até mesmo acusações criminais foram dirigidas contra os hospitais onde os surtos ocorreram (ABBOTT *et al.*, 2013).

Os métodos de tipagem bacteriana são de grande valia para identificar isolados patogênicos emergentes ou clones dentro de uma mesma espécie que causam as IRAS. A capacidade de diferenciar de forma rápida e confiável os isolados bacterianos relacionados é essencial para a vigilância epidemiológica e o combate dos surtos (VAN BELKUM *et al.*, 2007). Uma grande variedade de sistemas de tipagem está atualmente em utilização como as técnicas de: PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis), RAPD-PCR (Random amplification of polymorphic DNA), AFLP-PCR (*Amplified fragment length polymorphisms*), REP-PCR (Repetitive element palindromic) e MLST (*Multilocus sequence typing*), entre outras (HIGGINS *et al.*, 2012; PASANEN *et al.*, 2014).

Diante do exposto acima, o estudo da resistência aos antimicrobianos é, portanto, essencial, se tivermos o intuito de dar continuidade a tratamentos bem sucedidos em pacientes infectados com *A. baumannii* multirresistente (VILLALON *et al.*, 2013). Uma melhor avaliação genotípica das bactérias que circulam no ambiente hospitalar faz-se necessária, utilizando ferramentas genéticas como, reação em cadeia da polimerase (PCR), técnicas de clonagem e sequenciamento para detecção dos genes e das principais sequências de inserção; técnicas de tipagem para detecção da variabilidade genética, bem como a padronização de um teste de triagem capaz de detectar

rapidamente produtores de carbapenemases, para assim, auxiliar o laboratório clínico na rápida detecção desses patógenos e tomar as devidas providências para evitar possíveis surtos (DORTET *et al.*, 2014).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE- IRAS

Infecção hospitalar, também denominada institucional ou nosocomial, é qualquer infecção adquirida após a internação de um paciente em um hospital e pode se manifestar durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a hospitalização (BRASIL, 1997).

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são eventos adversos bastante persistentes nos serviços de saúde atuais. Sabe-se que a infecção leva à considerável elevação dos custos para as instituições de saúde no tratamento do paciente e, também, devido ao aumento do seu tempo de internação, observam-se também elevadas taxas de morbidade e mortalidade nos serviços de saúde do país (ANVISA, 2013b).

Considerando o aumento das condições que levam à internação de indivíduos com problemas de saúde cada vez mais graves e imunocomprometidos, juntamente com o crescente surgimento da resistência aos antimicrobianos, faz com que as IRAS tenham um papel de grande relevância para a saúde pública de todos os países. Destaca-se também que os países em desenvolvimento sofrem com maior carga de IRAS, podendo ser até 20 vezes superior aos países desenvolvidos (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014). Um estudo feito em 2002 estima que 1,7 milhões de infecções hospitalares ocorreram em hospitais dos Estados Unidos, tornando as IRAS a sexta maior causa de morte no país, com uma estimativa de custo de 5 a 10 bilhões de dólares anualmente. Dados semelhantes foram reportados na Europa, onde 175 mil pessoas morrem, em decorrência de IRAS, por ano (CHOPRA *et al.*, 2008; KLEVENS *et al.*, 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o fenômeno das IRAS como um problema de saúde pública. Preconiza que a autoridade de saúde responsável deve desenvolver um programa de âmbito nacional ou regional para

auxiliar os hospitais na redução das infecções relacionadas aos cuidados de saúde (WHO, 2004). No Brasil, a prevenção das IRAS se iniciou com a Portaria 196 de 24 de junho de 1983, publicada pelo Ministério da Saúde, a qual obriga todos os hospitais do país a terem uma Comissão de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH). O Governo Federal reconheceu as infecções hospitalares como um problema de saúde pública, e consolidou em 1997, a Lei Federal 9.431, que institui a obrigatoriedade da existência de Programas de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH), em todos os hospitais brasileiros (BRASIL, 1997; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

A nível nacional, ainda não se conhece a magnitude do problema das infecções relacionadas à atenção à saúde por meio de uma ampla pesquisa nacional. O que se possui são diversos dados de pesquisadores brasileiros evidenciando o grande impacto dessas infecções no sistema hospitalar do país, chamando a atenção para o aumento na mortalidade e morbidade dos pacientes nesses locais (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

Em 2005, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou dados oriundos do preenchimento de questionários por gestores estaduais, municipais e dirigentes dos hospitais brasileiros sobre aspectos estruturais, organizacionais e funcionais relacionados ao controle e prevenção das IRAS. No período, 4.148 hospitais retornaram as informações, correspondendo a 70% do número de hospitais no ano de 2003. Alguns dados chamam a atenção, como o não cumprimento da norma de 1983, que determina a obrigatoriedade das CCIHs, já que 24% dos hospitais não possuem CCIHs e o monitoramento das infecções hospitalares não é realizado em 23% das instituições. Em relação à gestão da utilização de antimicrobianos, germicidas e materiais médico-hospitalares, que são de grande importância no monitoramento e condutas para prevenção de infecções hospitalares, 40,8% informaram que não adotavam nenhuma norma, contribuindo para o surgimento de isolados multirresistentes. A restrição a exames microbiológicos em 35,6% dos hospitais, também contribui para o surgimento de

resistência aos antimicrobianos e para o aumento dos níveis de infecção hospitalar (ANVISA, 2005).

Nos últimos anos as infecções hospitalares causadas por bactérias multirresistentes Gram-negativas tem aumentado; as bactérias que se destacam por causarem infecções hospitalares são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., e *A. baumannii* (MACVANE, 2016).

2.2 MULTIDROGA-RESISTÊNCIA (MDR - MULTI-DRUG-RESISTANT)

Segundo a OMS, a resistência antimicrobiana é o desenvolvimento de resistência em microrganismos como bactérias, vírus, parasitos e fungos, a um antimicrobiano que era previamente suscetível. A resistência antimicrobiana é uma ameaça crescente e que vem preocupando todos os países, principalmente pela disseminação de bactérias multirresistentes que não respondem ao tratamento utilizado normalmente para as infecções comuns que causam (WHO, 2015a).

A resistência antimicrobiana se comporta como um grande desafio para todas as partes do mundo e é considerada um problema de saúde pública que vem crescendo cada vez mais. A disseminação da resistência é favorecida devido ao uso indevido de antimicrobianos, à falta de programas de prevenção às IRAS e à vigilância inadequada na regulação do uso dos medicamentos antimicrobianos (WHO, 2015b).

Com a perda da efetividade dos antimicrobianos utilizados normalmente, complicações infecciosas que são comuns em pacientes vulneráveis, como os imunocomprometidos, submetidos à quimioterapia, diálise e cirurgias, tornam-se um desafio para serem tratadas, pois muitas dessas infecções são por bactérias resistentes a várias classes de antimicrobianos (CDC., 2013).

No relatório publicado pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention) em 2013, as superbactérias, como são tratadas as bactérias resistentes a múltiplos fármacos foram classificadas como ameaça preocupante, grave e urgente. Foram

citados 18 microrganismos, onde a maioria faz parte das bactérias Gram-negativas como as Enterobactérias, *P.aeruginosa*, *A. baumannii*, *Salmonella* sp. entre outras. Nesse documento também foi estimado o número mínimo de doenças e mortes causadas pela resistência aos antimicrobianos: 2,05 milhões e 23.000, respectivamente (CDC., 2013).

Nos Estados Unidos cerca de 650.000 mil indivíduos tiveram IRAS anualmente e mais de 20% foram causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos. Os custos para a saúde, por cada caso, podem chegar a 85.000 mil dólares a mais, isso em comparação com a mesma situação no caso de uma bactéria suscetível aos antimicrobianos (MACVANE, 2016).

Apesar dos dados serem referentes aos Estados Unidos e à Europa, eles devem ser observados com grande atenção pelo Brasil e outros países, pois, é provável que apresentem números alarmantes semelhantes.

2.3 *Acinetobacter* spp. MULTIDROGA-RESISTENTE (MDR)

A. baumannii é um cocobacilo Gram-negativo aeróbio não móvel, não fermentador da lactose, oxidase, indol e esculina negativos e catalase positivo. Cresce em ágar padrão não seletivo; suas colônias em ágar sangue aparecem opacas ou brancas, mucoides, lisas, não hemolíticas e são menores que as das enterobactérias. Em ágar MacConkey aparece como um fraco fermentador da lactose (ABBOTT *et al.*, 2013; CHUANG *et al.*, 2011; PELEG *et al.*, 2008).

O gênero *Acinetobacter* spp. compreende 31 espécies diferentes, 17 não foram nomeadas devido raridade de sua ocorrência em infecções humanas. Recentemente *Acinetobacter* foi classificado como membro da família *Moraxellaceae* da ordem *Gammaproteo-bacteria*. *Acinetobacter baumannii* faz parte do *A. baumannii-calcoaceticus* o qual compreende ainda *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis* e *Acinetobacter calcoaceticus*. Entre as espécies do complexo, não é possível fazer a distinção pelos meios utilizados na rotina do laboratório clínico, somente

por métodos moleculares (PELEG *et al.*, 2008; POIREL; NORDMANN, 2006).

A espécie *Acinetobacter baumannii* é a representante mais importante do gênero *Acinetobacter* spp. É considerado o patógeno de maior relevância dentro do Complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, de onde faz parte (PELEG *et al.*, 2008). Devido à dificuldade na separação das espécies desse complexo a partir de testes convencionais, a maioria dos trabalhos e revisões a respeito desse assunto, citam diretamente *A. baumannii* por ser a espécie mais prevalente e de maior importância clínica.

Acinetobacter spp. tem a capacidade de sobreviver em ambientes úmidos e secos bem como em alimentos e em pele saudáveis como, por exemplo, nas mãos de manipuladores de alimentos e profissionais da saúde. É mais comumente encontrado associado aos ambientes hospitalares e, tem como principal alvo, pacientes mais vulneráveis (ABBOTT *et al.*, 2013; KEMPF; ROLAIN, 2012; PELEG *et al.*, 2008).

Outra característica que favorece a colonização e a infecção dos pacientes é a formação de biofilme. O biofilme facilita a adesão da bactéria aos materiais plásticos hospitalares como cateteres e tubos de ventilação mecânica. Tem sido demonstrada também, a interação entre o *pili* bacteriano e o lipopolissacarídeo, que parece promover a adesão às células hospedeiras e, assim, iniciar o processo de colonização (LEE *et al.*, 2008).

A. baumannii é intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos, dentre eles as penicilinas, ampicilinas, macrolídeos, cefalosporinas de segunda e terceira geração, ciprofloxacina e cloranfenicol. Em infecções causadas por *Acinetobacter* spp. não MDR, pode-se usar o antimicrobiano sozinho ou em combinação, como ceftazidima, carbapenênicos, sulbactam, piperacilina/tazobactam, aminoglicosídeos e quinolonas (KIM *et al.*, 2014). Os carbapenênicos, antimicrobianos beta-lactâmicos de amplo espectro, são considerados de última escolha para esse tipo de infecção, pois uma vez resistente aos carbapenênicos, geralmente apresentam resistência a todos os beta-lactâmicos (CDC., 2013).

Nos últimos anos, devido às infecções por *A. baumannii* MDR resistentes aos carbapenêminos, o uso de antimicrobianos antigos como as polimixinas, que antes foram deixados de lado pela sua grande nefrotoxicidade, voltaram a ser utilizados, sendo a última opção no tratamento dessas infecções (CHOPRA *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2014). Além disso, a concentração inibitória mínima da polimixina para os isolados tem-se elevado, o que torna a situação bastante preocupante (ABBO *et al.*, 2007).

O uso da terapia combinada para o tratamento de organismos multirresistentes tornou-se uma área de grande interesse. Essa estratégia tem como objetivo criar uma combinação ativa de dois ou mais agentes para aqueles microrganismos que, em laboratório, não são suscetíveis aos antimicrobianos. Além de tentar melhorar a eficácia, a terapia combinada pode ajudar a prevenir o surgimento de resistência, quando pelo menos um agente é ativo *in vitro* (PELEG *et al.*, 2008).

A terapêutica para infecções multirresistentes baseia-se na utilização de polimixina B ou polimixina E (colistina) em associação com um ou mais dos antimicrobianos, como aminoglicosídeos (gentamicina ou ampicacina), carbapenêmicos (meropenem ou doripenem) e tigeciclina. Deve-se sempre usar associações de dois ou três antimicrobianos, sendo um deles a polimixina B ou E. É preciso evitar a utilização de monoterapias pelo risco de rápido desenvolvimento de resistência. A escolha do(s) fármaco(s) de associação com polimixina B ou E deve ser baseada, preferencialmente, no perfil de suscetibilidade de resistência aos carbapenêmicos detectadas no hospital ou por meio de dados locais. Faz-se necessário considerar igualmente o local de infecção e a penetração esperada do antimicrobiano na escolha do fármaco a ser utilizado na combinação (ANVISA, 2013a).

Porém, a terapia de combinação de polimixina com outros antimicrobianos tem sido bastante controversa entre os pesquisadores. Alguns estudos mostram que a combinação pode levar a uma significativa diminuição das taxas de erradicação do microrganismo, mas não demonstra uma diminuição nas taxas

de mortalidade comparado com o uso da monoterapia (KIM *et al.*, 2014). Outro estudo recente de meta-análise mostra que a associação de antimicrobianos não apresenta nenhuma evidência de benefício comparado com a monoterapia em infecções causadas por *Acinetobacter* MDR (PAUL *et al.*, 2014).

A. baumannii multidroga-resistente (MDR) foi classificado como uma ameaça grave no documento publicado pelo CDC, comentado anteriormente, que classifica as superbactérias. Segundo o CDC, são requeridas medidas rápidas para garantir que o problema não cresça e se torne um surto dentro de uma instituição de saúde (CDC., 2013). Estima-se que tenha 12.000 infecções causadas por *Acinetobacter* spp., sendo que 7.300 são por bactérias multirresistentes que causam em torno de 500 mortes anualmente; 2% das IRAS são causadas por *A. baumannii*, porém, essa taxa aumenta para 7% quando o paciente está sob ventilação mecânica (CDC., 2013).

A. baumannii causa, principalmente, pneumonia e sepse entre pacientes criticamente doentes e, a maioria dessas infecções são por bactérias MDR, que são resistentes a mais de três classes de antimicrobianos. Desde as primeiras revisões publicadas em 1970 é o agente principal das pneumonias em pacientes hospitalizados (GLEW *et al.*, 1977). Nos últimos tempos, infecções do sistema nervoso central, pele, tecidos moles e ossos têm emergido como um grande problema em algumas instituições de saúde (PELEG *et al.*, 2008).

Em um estudo em que foram coletadas 5.127 amostras de *Acinetobacter* spp. entre 2005 e 2009, em 32 países, compreendendo 140 hospitais na América do Norte, Europa, América Latina e região Ásia-Pacífico, mostrou a taxa de não suscetibilidade para imipenem e meropenem de 45,9% e 48,2%, respectivamente. Em 2005, a porcentagem de não suscetibilidade foi de 27,8% para imipenem e 37,5% para meropenem, em comparação com 2009, que teve taxas maiores de 62,4% e 64,4% para o imipenem e meropenem, respectivamente. A taxa de resistência aos carbapenêmicos é mais prevalente no Oriente Médio, América Latina e na borda da Ásia-Pacífico do que na Europa ou na América do Norte (ENDO

et al., 2012; KIM *et al.*, 2014; MENDES *et al.*, 2010; WANG; DOWZICKY, 2010). A Figura 1, modificada de (KIM *et al.*, 2014), mostra as taxas de resistência global aos carbapenêmicos em *A. baumannii*.

Figura 1: Epidemiologia global de *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos.



Fonte: modificado de Kim, *et al* (2014).

2.4 PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM *Acinetobacter* spp.

A plasticidade genômica em *Acinetobacter* spp. é bastante evidente, com isso, a resistência antimicrobiana nesse grupo está associada a vários mecanismos moleculares, como: a redução na expressão de porinas (CarO e Omp33), a superexpressão de sistemas de efluxo e de Beta-lactamases (como AmpC e OXA-51-*like*) (RUMBO *et al.*, 2013).

2.4.1 Redução na expressão de porinas

As porinas são proteínas da membrana externa (OMPs) que permitem o transporte de moléculas através da bicamada lipídica. Podem agir como alvos potenciais para adesão a outras células e ligação de compostos bactericidas na superfície de bactérias Gram-negativas (ABBOTT *et al.*, 2013; RUMBO *et al.*, 2013).

Variações na estrutura ou regulação da expressão de porinas podem proporcionar um mecanismo de escape da pressão seletiva dos antimicrobianos. Essas estratégias foram desenvolvidas por muitas bactérias como forma de sobrevivência, podendo desempenhar um papel importante nos mecanismos de resistência (RUMBO *et al.*, 2013; VILA *et al.*, 2007). Em *A. baumannii* são conhecidos os genes e proteínas da membrana externa: *oprC*, *oprD*, *ompW*, *ompA*, *carO*, *omp33*, *dcap-like*, *oprB*, e *omp25* (RUMBO *et al.*, 2013).

Sugere-se que a causa da resistência intrínseca a alguns agentes antimicrobianos pode ser atribuída ao menor número de porinas, bem como ao seu tamanho reduzido. Porém, outra hipótese pode ser o alto nível de expressão de um ou vários sistemas de efluxo ativos, ou ainda, a interação entre ambos: a baixa permeabilidade via porinas e a superexpressão de bombas de efluxo (VILA *et al.*, 2007).

A análise da sequência de aminoácidos revela a estrutura típica das porinas encontradas em bactérias Gram-negativas: um índice de hidropatia extremamente negativo, ausência de trechos de resíduos hidrofóbicos, uma carga total ligeiramente negativa, baixo índice de instabilidade, com elevado teor de glicina e uma ausência de resíduos de cisteína (GRIBUN *et al.*, 2003).

Três OMPs foram relatadas como ausentes em isolados resistentes ao imipenem: a proteína de 33-36 KDa, uma proteína de 29 KDa, designada CarO e uma proteína de 43 KDa, que apresenta significativa homologia com OprD de *P. aeruginosa*, que é uma porina também chamada D2, conhecida por estar envolvida na resistência aos carbapenêmicos (POIREL; NORDMANN, 2006).

Várias porinas, incluindo a proteína de 33-KDa e CarO, constituem um canal de poros para o influxo de carbapenêmicos, estando envolvidas na resistência desses antimicrobianos. Outra OMP de *A. baumannii* é a OmpW, que apresenta uma elevada homologia com OmpW encontrada em *E. coli* e *P. aeruginosa* (VILA *et al.*, 2007).

A resistência ao imipenem e meropenem em isolados clínicos *A. baumannii* multirresistentes também tem sido associada com a perda de CarO. A falta de CarO em diferentes isolados clínicos resultou da ruptura do gene por elementos distintos de inserção, apoiando a hipótese de que CarO participa do influxo de antimicrobianos em *A. baumannii* (POIREL; NORDMANN, 2006).

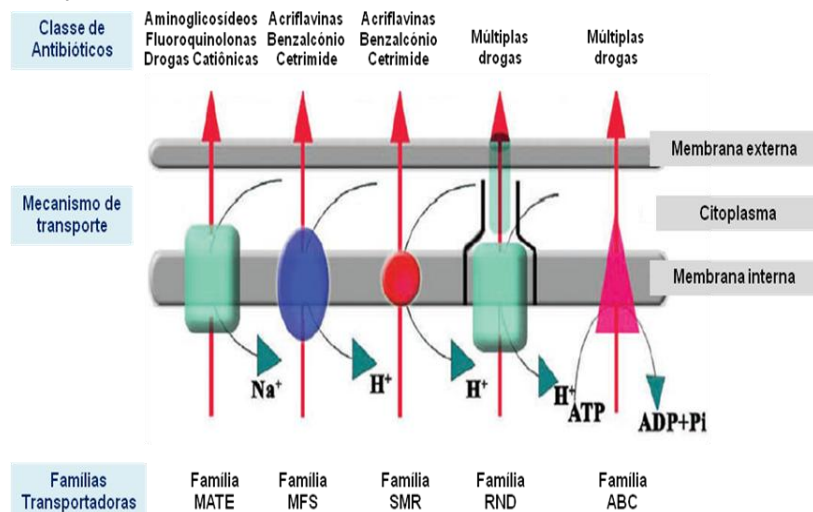
2.4.2 Superexpressão de bombas de efluxo

Bombas de efluxo têm papéis multifatoriais. Esse mecanismo é importante para a desintoxicação de metabólitos intracelulares, para a virulência bacteriana (em ambos os hospedeiros vegetais e animais), para a sinalização do tráfico intercelular, e para a homeostase celular (RUMBO *et al.*, 2013).

Cinco superfamílias de sistemas de efluxo têm sido associadas à resistência aos medicamentos: a superfamília ABC (ATP-binding Cassette Superfamily); a família SMR (Small Multidrug Resistance Family), composta por AbeS, que confere resistência, principalmente, aos detergentes e corantes; a família MATE (Multidrug and Toxic-compound Extrusion Family), composta por AbeM; a superfamília MFS (Major Facilitator Superfamily), composta pela bomba CraA que confere resistência intrínseca ao cloranfenicol; e a superfamília RND (Resistance Nodulation Division) (COYNE *et al.*, 2011; COYNE *et al.*, 2010; POOLE, 2004). Dependendo do isolado, *A. baumannii* pode codificar cromossomicamente 7 RND, mais de 30 MFS, vários MATE e SMR, e os sistemas de efluxo ABC. Até o presente momento, três RND, dois membros da MFS e um membro da família SMR e MATE parecem envolvidos no sistema

de efluxo de antimicrobianos em *A. baumannii* (COYNE *et al.*, 2011) (Figura 2).

Figura 2: Representação das cinco famílias de bombas de efluxo em *Acinetobacter baumannii* juntamente com seus mecanismos de transporte.



MATE: Multidrug And Toxic compound Extrusion; MFS: Major Facilitator Superfamily; SMR: Small multidrug resistance; RND: Resistance nodulation division and ABC: ATP-Binding Cassette transporters.

Fonte: modificada de (BHARDWAJ; MOHANTY, 2012).

Três sistemas RND, AdeABC, AdeIJK e AdeFGH, foram caracterizados e relatados por causar multidroga resistência em *A. baumannii* (COYNE *et al.*, 2011).

AdeABC é o primeiro sistema RND caracterizado em *A. baumannii*. Esse sistema é composto por uma proteína de membrana interna (bomba RND), ligada por uma grande proteína de fusão (MFP) a um fator de membrana externo (OMF), capaz de expulsar uma grande variedade de substratos. O operon AdeABC codifica para AdeA MFP, para AdeB transportador de multidrogas e para AdeC OMF (NIKAIIDO; TAKATSUKA, 2009; POOLE, 2004).

O principal mecanismo de efluxo associado com a resistência a carbapenêmicos em *A. baumannii* é codificado cromossomicamente pela bomba de efluxo tripartite, AdeABC, que é presente em aproximadamente 80% de isolados clínicos dessa espécie (ABBOTT *et al.*, 2013; POIREL; NORDMANN, 2006).

A superexpressão do AdeABC é fortemente regulada pela expressão de um sistema de dois componentes reguladores AdeR-AdeS, codificada pelo operon *adeRS*, localizado a montante do gene AdeABC e transcrito na direção oposta (MARCHAND *et al.*, 2004) e, também, pela inserção de uma cópia de ISAb1 a montante do operon (COYNE *et al.*, 2010), conferindo resistência aos aminoglicosídeos, diminuição da suscetibilidade a fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprim e brometo de etídio, bem como para a netilmicina e meropenem. A sinergia entre oxacilinas adquiridas e da bomba AdeABC foram relatadas e implicadas em níveis mais elevados de resistência aos Beta-lactâmicos, incluindo carbapenêmicos (ABBOTT *et al.*, 2013; COYNE *et al.*, 2011).

O segundo sistema de efluxo RND descrito por *A. baumannii* é o *AdelJK*, codificado pelo operon *adelJK*. Essa bomba contribui para a resistência intrínseca de Beta-lactâmicos, tais como a ticarcilina, cefalosporinas, e aztreonam; fluoroquinolonas, tetraciclina, tigeciclina, lincosamidas, rifampicina, cloranfenicol, co-trimoxazol, novobiocina e ácido fusídico (DAMIER-PIOLLE *et al.*, 2008).

AdelJK pode agir de forma sinérgica com AdeABC para expulsar compostos como a tigeciclina. A superexpressão de *AdelJK* é sempre menor do que as observadas para AdeABC, sugerindo que esse sistema pode ser superexpresso somente até um limite, e que, em seguida, torna-se tóxico para a própria célula (DAMIER-PIOLLE *et al.*, 2008).

Nenhum gene de regulação é observado adjacente ao operon *AdelJK*, e não foram detectadas mutações na suposta região promotora de mutantes *AdelJK* superexpressos (COYNE *et al.*, 2011).

AdeFGH é a terceira bomba de efluxo RND, o operon AdeFGH é considerado responsável pelo fenótipo de MDR em mutantes. AdeFGH pode conferir resistência de alto nível para a clindamicina quando superexpressos, e o aumento dessa expressão em *A. baumannii* é um mecanismo adicional para a resistência de alto nível às fluoroquinolonas e diminuição da suscetibilidade à tigeciclina. Uma janela aberta de leitura, que codifica para um regulador de transcrição do tipo LysR, denominado adeL, foi localizado a montante do operon AdeFGH e transcrito na direção oposta. Mutações em adeL foram encontrados em mutantes com superexpressão AdeFGH, sendo responsáveis pela superexpressão de AdeFGH (COYNE *et al.*, 2010).

Infecções causadas por *Acinetobacter* spp. continuam a desafiar os médicos e profissionais da saúde que trabalham com controle de infecção em todo o mundo. O organismo parece perfeitamente adaptado para prosperar em ambientes severos de UTIs sob grande pressão de seleção de antimicrobianos e desinfetantes. Fontes definidas de surtos hospitalares têm sido numerosas devido à capacidade do organismo de sobreviver sob uma série de condições no ambiente hospitalar.

Esses mecanismos têm contribuído para a multidroga resistência (MDR) dos isolados que estão circulando nos ambientes hospitalares. Uma avaliação mais acurada do papel desses mecanismos é de grande importância para auxiliar na conduta terapêutica, no desenvolvimento de novos marcadores de diagnóstico e no desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas, bem como na avaliação dos genes específicos desses isolados para uma análise mais acurada dos clones que são responsáveis pelos surtos nas unidades hospitalares (KUO *et al.*, 2014; PAJAND *et al.*, 2013).

2.4.3 Metallo-Beta-lactamases, classe B (MBL)

Em *A. baumannii*, a resistência intrínseca aos Beta-lactâmicos é mediada principalmente por uma cefalosporinase AmpC cromossomicamente codificada. Entretanto, cefepima e

carbapenêmicos parecem ser estáveis à ação enzimática (KEMPF; ROLAIN, 2012), sendo a resistência aos carbapenêmicos explicada pela combinação de mecanismos aqui descritos e/ou pela presença de diferentes classes de carbapenemases (Classe A, B ou D).

Existem cinco grupos de MBLs identificados (*IMP-like*, *VIM-like*, SIM-1, SPM-1 e GIM-1), mas apenas os três primeiros desses grupos foram identificados em *A. baumannii*. O grupo IMP é composto atualmente por 19 variantes que se aglomeram em oito filogrupos (IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6 e IMP-10 IMP-11 e IMP-19) (ABBOTT *et al.*, 2013; POIREL; NORDMANN, 2006).

Enzimas VIM são mais raras de serem encontradas no gênero *Acinetobacter*, representadas apenas por VIM-2 e SIM-1. As variantes de IMP e VIM conferem um elevado nível de resistência aos carbapenêmicos, bem como resistência a todos os Beta-lactâmicos, exceto aztreonam, devido a sua forte eficiência hidrolítica contra esses antimicrobianos. Análises ao redor dos genes que codificam para MBL revelam sequências muito semelhantes, uma vez que os genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* ou *bla_{SIM}* são incorporados na estrutura de Integrons de classe 1 (ABBOTT *et al.*, 2013).

A transcrição de genes de Beta-lactamases é reforçada por diferentes sequências de inserção (ISs) localizadas em sua proximidade. As ISs mais comumente associadas com genes de carbapenemases em *A. baumannii* MDR são ISAb1, ISAb2, ISAb3, ISAb4 e IS18 (VILLALON *et al.*, 2013).

Os genes de MBL fazem parte de cassetes de genes que são inseridos entre o segmento 5' conservado (5'-CS) e o 3'-CS, em conjunto com outro cassete de genes que conferem resistência a outras classes de antimicrobianos, principalmente enzimas que codificam para aminoglicosidasas. Além disso, a localização de genes de MBL nos plasmídios explica sua propagação entre *A. baumannii* e *P. aeruginosa* em áreas específicas de cada país (POIREL; NORDMANN, 2006).

2.4.4 Oxacillinases hidrolisantes de carbapenêmicos, Beta-lactamases de classe D (CHDLs)

Em isolados de *Acinetobacter* spp., um dos mecanismos mais prevalentes é a expressão de enzimas do tipo OXA pertencentes à Beta-lactamases da classe D, como a OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 e OXA-51 (intrínseca) (ABBOTT *et al.*, 2013). Oxacillinases são Beta-lactamases incomuns que formam um grupo heterogêneo no que diz respeito às suas propriedades estruturais ou bioquímicas. Somente algumas variantes hidrolisam cefalosporinas de espectro ampliado (observado em *P. aeruginosa*, mas nunca em *A. baumannii*). Nesses casos, as enzimas responsáveis, são muitas vezes, derivadas de enzimas de espectro estreito. A eficiência hidrolítica das CHDLs contra carbapenêmicos é muito mais baixa (100-1.000 vezes menor do que a das MBL), o que é uma propriedade que pode complicar a identificação dessa resistência. CHDLs desse tipo são identificadas com frequência em *A. baumannii*.

Embora CHDLs hidrolisem fracamente os carbapenêmicos, elas podem conferir resistência quando superexpressas. Esta resistência é mediada por meio de uma combinação natural de baixa permeabilidade para Beta-lactâmicos, superexpressão de bombas de efluxo e elementos ISAb_a localizadas a montante do gene. Vários estudos sugerem que o maior nível de resistência aos carbapenêmicos é devido à expressão de genes juntamente com um promotor forte, tal como o fornecido pela sequência de inserção móvel ISAb_a1, conferindo maior resistência (KUO *et al.*, 2014; PASANEN *et al.*, 2014).

A identificação de um gene que codifica para CHDL foi relatada pela primeira vez em *A. baumannii* em 1955, na Escócia. Essa enzima, originalmente denominada ARI-1, foi identificada na Escócia e foi encontrada em um plasmídio (ABBOTT *et al.*, 2013; PELEG *et al.*, 2008). A enzima foi renomeada como OXA-23 após a sua caracterização genética e bioquímica, e contém 56% de similaridade de aminoácidos com OXA-51/69. OXA-23 faz parte do subgrupo CHDL, que também inclui OXA-27 e OXA-49; OXA-27 difere da OXA-23 pela

substituição de uma treonina para alanina e de um aspartato para lisina, nas posições 95 e 247 DBL (sistema de numeração Beta-lactamases de classe D), respectivamente; enquanto que OXA-49 foi identificada em um único isolado de *A. baumannii* isolada na China, e difere de OXA-23 por uma lisina no lugar da glutamina na posição 178 DBL, e um resíduo de alanina adicional na posição 222 DBL. O sistema de numeração DBL foi estabelecido para analisar as estruturas moleculares da Beta-lactamase classe D, em analogia com o sistema de numeração adotada para as enzimas da classe A (POIREL; NORDMANN, 2006).

Um segundo grupo de CHDLs, que compreende OXA-24, OXA-25, OXA-26 e OXA-40, partilha 63% e 60% de identidade aminoacídica com OXA-51/69 e OXA-23, respectivamente. Um terceiro grupo de CHDLs contém OXA-58, que partilha 59% dos aminoácidos com OXA-51/69 e <50% com outras CHDLs.

A disseminação de *A. baumannii* produtor de OXA-23 está cada vez mais generalizada, com relatos na África, Europa, Oceania, Ásia, China e América do Sul (CARVALHO *et al.*, 2009). No Brasil, foram identificados isolados em várias cidades, como Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Belo Horizonte (MG), Porto Alegre (RS), Blumenau (SC), Curitiba (PR), São Luiz (MA) e Salvador (BA), além de outros países da América Latina, como Colômbia (DALLA-COSTA *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2011; WERNECK, 2010). O gene OXA-58 também foi identificado em isolados clínicos de *A. junii*, na Romênia e na Austrália, mostrando, assim, o potencial de disseminação de OXA-23 no gênero *Acinetobacter* (MARQUE *et al.*, 2005).

Os genes *bla*OXA-23 e *bla*OXA-58 foram identificados principalmente em plasmídios, já os genes CHDLs, pertencentes ao cluster *bla*OXA-24, parecem ser localizados apenas cromossomicamente. Análises de sequências têm indicado que o elemento ISAb1, pertencente à família IS4, é identificado a montante do gene *bla*OXA-23, independentemente da origem geográfica do isolado. Outro elemento, ISAb4, pertencente à família IS982, foi também identificado em isolados de *A. baumannii*. A presença desses elementos IS a montante do gene

*bla*OXA-23 indica que eles podem fornecer regiões promotoras fortes, alterando a expressão do gene e podem também desempenhar um papel no processo de aquisição e disseminação desses genes de resistência (POIREL; NORDMANN, 2006).

Em relação ao gene *bla*OXA-58, este foi delimitado por elementos que desempenham um papel na sua expressão. Em particular, ISAb2 (família IS3), ISAb3 (família IS1) e IS18 (família IS30), bem como ISAb1, que forneceram sequências promotoras, reforçando a expressão do gene *bla*OXA-58 (KUO *et al.*, 2014; POIREL; NORDMANN, 2006). Embora as sequências ISAb1 sejam comumente detectadas nos genomas de ambas as linhagens suscetíveis e resistentes aos carbapenêmicos, a inserção de sequências ISAb1 a montante do *bla*OXA é exclusiva para a maioria dos isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, sugerindo que a recombinação genética por meio da transposição de sequências de inserção (IS) podem conferir resistência aos carbapenêmicos na maioria dos isolados clínicos (KUO *et al.*, 2014).

2.5 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES

Os objetivos do Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) são assegurar a suscetibilidade às drogas de escolha para infecções específicas e detectar uma possível resistência dos agentes patogênicos aos antimicrobianos. Entretanto, fornece pouca informação sobre os mecanismos envolvidos na resistência bacteriana. Considerando que diferentes determinantes de resistência se propagam diferentemente no ambiente (com maior ou menor eficiência), a detecção dos mecanismos mais facilmente transferíveis entre as bactérias deve ser prioridade na prevenção de surtos por bactérias MDR. Dentre os determinantes de resistência citados acima, as carbapenemases merecem destaque por, geralmente, estarem associadas com elementos genéticos móveis.

A presença de carbapenemases pode ser detectada fenotipicamente por uma série de métodos no laboratório clínico,

incluindo sinalização por sistemas automatizados, ágar seletivo, teste de Hodge modificado, E-tests ou testes de discos combinados (ABBOTT *et al.*, 2013). Também pode ser detectada por métodos enzimáticos simples, como é o caso do teste Carba NP (NORDMANN *et al.*, 2012).

Os sistemas automatizados trabalham com cartões ou painéis de antimicrobianos em que são feitas duas a quatro diluições, em geral, dependendo do equipamento, que representam as concentrações referentes aos limites de suscetibilidade ou resistência de cada antimicrobiano. Reduzido o tempo de incubação e o número limitado dessas diluições (devido ao grande número de antimicrobianos a serem testados) podem interferir na acurácia do teste. Alguns equipamentos não apresentam uma boa sensibilidade na detecção da expressão de alguns mecanismos de resistência, principalmente, os mecanismos de resistência induzíveis, que demandam maior tempo para sua expressão, ou quando os isolados apresentam mecanismos de resistência variados, como para distinguir produtores de carbapenemase ESBL e/ou AmpC combinados com a perda de porinas (WOODFORD *et al.*, 2010).

Observa-se, ainda, uma falsa resistência para *A. baumannii* utilizando sistemas automatizados, devido à redução da concentração de imipenem nos cartões do sistema e o reduzido tempo de incubação. Dessa forma, para melhorar essa falha, os cartões apresentam também o meropenem, no qual são observadas taxas de concordância mais elevadas e taxas de erro mais baixas devido à maior estabilidade do mesmo (TSAKRIS *et al.*, 2000).

A modificação dos painéis de teste de antimicrobianos para a inclusão de testes de sinergia entre carbapenêmicos e inibidores de Beta-lactamases, tal como o ácido fenilborônico para enzimas KPC, cloxacilina para AmpC e ácido dipicolínico ou de EDTA para metalo-Beta-lactamases, permite estabelecer critérios interpretativos mais rígidos, podendo esperar uma melhora na especificidade (AYBEY *et al.*, 2011; WOODFORD *et al.*, 2010).

Falsa suscetibilidade ou falsa resistência obtidas por meio de sistemas automatizados podem levar à escolha inadequada de medicamentos para o tratamento de pacientes. Devido a isso, resultados suscetíveis e resistentes obtidos na clínica, a partir de sistemas automatizados, deveriam ser confirmados por métodos de referência, especialmente para as bactérias não fermentadoras e antimicrobianos Beta-lactâmicos. Porém, em se tratando de uma triagem de bactérias isoladas para posterior confirmação com métodos genéticos, o sistema automatizado é de grande valia.

Preparações de ágar seletivo e cromogênicos têm sido utilizados na detecção de *A. baumannii* MDR, a partir de culturas de vigilância. O meio de cultura inclui um substrato cromogênico e agentes que inibem o crescimento de outros isolados Gram-negativos e Gram-positivos e de leveduras. Colônias de *Acinetobacter* spp. são visualizadas na cor salmão brilhante, porém, o CHROMagar™ *Acinetobacter* (CHROMagar) não tem a capacidade de diferenciar isolados sensíveis aos carbapenêmicos dos resistentes (WOODFORD *et al.*, 2010). Mais recentemente, com a adição do 'Suplemento *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase' (CHROMagar KPC), o ágar tem a capacidade de selecionar somente *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (colônias creme opacas), inibindo o crescimento de *A. baumannii* sensíveis aos carbapenêmicos. Outras bactérias também resistentes aos carbapenêmicos aparecem com colorações diferentes do que as colônias do *A. baumannii*. CHROMagar™ *Acinetobacter* pode ter a adição de um suplemento opcional, CR102, para selecionar especificamente *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (colônias vermelhas), sendo que outras bactérias Gram-negativas serão na sua maioria inibidas (ABBOTT *et al.*, 2013; AJAO *et al.*, 2011; WAREHAM; GORDON, 2011).

O teste de Hodge modificado, amplamente utilizado em laboratórios de diagnóstico microbiológico, apresenta baixa sensibilidade para detecção de NDM (New Delhi metallo-Beta-lactamase) ($\leq 50\%$); portanto, este não deve ser utilizado para detecção de carbapenemases, em particular NDM. Como

alternativa, deve-se utilizar potenciadores e inibidores para a detecção de carbapenemases. As metalo-Beta-lactamases apresentam dois íons de zinco em seu sítio catalítico; portanto, a sua detecção baseia-se no uso de substâncias que atuam como quelantes desses íons, uma das substâncias mais utilizadas é o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As KPCs são inibidas pelo ácido fenilborônico, mas não ocorre potenciação quando é adicionada a cloxacilina. As AmpCs plasmidiais são inibidas pelo ácido fenilborônico, porém, ocorre potenciação quando é adicionada a cloxacilina, podendo assim, ser diferenciadas das KPCs (GIRLICH *et al.*, 2012; QUEENAN; BUSH, 2007; TSAKRIS *et al.*, 2010).

Recentemente, o teste Carba NP foi desenvolvido para a identificação precoce de carbapenemases em enterobactérias. O Carba NP é um método fenotípico para detecção de carbapenemases, baseado na hidrólise *in vitro* do imipenem por um lisado de bactérias, o qual é detectado pela mudança do pH, usando o indicador vermelho de fenol. Essa técnica vem se mostrando rápida, sensível e específica (DORTET *et al.*, 2012; NORDMANN; POIREL, 2013; VASOO *et al.*, 2013).

Outra técnica bastante semelhante ao Carba NP, desenvolvida recentemente, é o teste Blue-Carba, o qual tem o mesmo princípio da hidrólise do imipenem e a detecção pela mudança do pH, porém, nesse caso, utilizando o indicador azul de bromotimol. Essa técnica, além de todas as qualidades citadas pela técnica Carba NP, é mais adequada para *Acinetobacter baumannii* que apresenta alguns resultados falsos negativos no teste Carba NP. Pode ser feita direto da cultura bacteriana, sem necessidade da utilização de uma solução de lise, e tem a possibilidade de utilizar o imipenem na forma comercial, sendo muito mais econômico para uma rotina laboratorial (PIRES *et al.*, 2013).

Técnicas moleculares para detecção genotípica são o padrão ouro para detecção de carbapenemases. Destacam-se o PCR gene-específico, o PCR multiplex e, mais recentemente, os Microarranjos (Microarrays) que conseguem detectar vários genes de resistência em uma única reação. O limite das técnicas

moleculares continua sendo a falha em detectar produtores de carbapenemases devido aos genes que ainda são desconhecidos (ABBOTT *et al.*, 2013; BONNIN *et al.*, 2012; CUZON *et al.*, 2012)

Os métodos fenotípicos descritos acima são mais baratos e rápidos do que as técnicas moleculares, as quais são úteis, principalmente, para fins epidemiológicos e de pesquisa. Além disso, acabam sendo mais demoradas devido à utilização de equipamentos específicos que não são encontrados em todos os laboratórios de microbiologia (DORTET *et al.*, 2012; NORDMANN; POIREL, 2013; VASOO *et al.*, 2013). Apesar de fundamental epidemiologicamente, a amplificação gênica é aplicada somente quando se conhece o gene a ser detectado, fornecendo resultados falso-negativos na presença de novos genes ou mesmo de novas variantes gênicas com mutações no sítio de ligação dos iniciadores. Porém, são importantes para se ter o conhecimento epidemiológico de quais genes de resistência as bactérias circulantes em um hospital possuem. Assim, é desejável que os laboratórios clínicos possam contar com métodos rápidos e baratos para a triagem de carbapenemases e, posteriormente, aliar a métodos moleculares para detecção dos genes de resistência.

2.6 MÉTODOS PARA ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA

A identificação da variabilidade dos organismos dentro de uma espécie é chamada de tipagem. Os métodos de tipagem conseguem distinguir isolados bacterianos diferentes em uma mesma espécie, consistindo em uma ferramenta epidemiológica essencial no controle e prevenção de infecções. A tipagem bacteriana gera um genótipo ou fenótipo que pode ser utilizado para elucidar as fontes e vias de propagação de bactérias, usado para identificar isolados patogênicos emergentes ou clones (SABAT *et al.*, 2013; VAN BELKUM *et al.*, 2007). Existe um grande número de métodos de tipagem utilizados atualmente, que variam muito em relação ao custo, trabalho, confiança e

capacidade de discriminação das bactérias (FOXMAN *et al.*, 2005; MACCANNELL, 2013).

Entre os métodos de tipagem, temos: a Eletroforese de Campo Pulsado, conhecida como PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), que tem sido considerada como padrão ouro entre os métodos de tipagem molecular. Essa técnica utiliza enzimas de restrição de corte raro, com posterior eletroforese de campo pulsado para separação dos fragmentos. A principal vantagem do método é que aborda uma grande parte do genoma que está sendo investigado (>90%). Apesar de ser considerado o padrão ouro, é um método tecnicamente exigente, trabalhoso e demorado (DURMAZ *et al.*, 2009; FOXMAN *et al.*, 2005).

Algumas técnicas de tipagem são utilizadas juntamente com a de PCR (Reação em Cadeira da Polimerase), como é o caso do RFLP-PCR, também conhecido como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), que utiliza enzimas de restrição para clivagem do DNA, com posterior amplificação dos fragmentos gerados. O RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) é uma técnica de amplificação aleatória de DNA, que utiliza sequências arbitrárias, como iniciadores curtos (normalmente de 10 bases) os quais têm como alvo, várias sequências genômicas não especificadas (MACCANNELL, 2013).

Ainda em técnicas que utilizam a PCR, a Rep-PCR (*Repetitive Element Palindromic PCR*) se destaca por ter uma boa correlação com os resultados obtidos pelo PFGE, que é considerado padrão ouro (OLIVE; BEAN, 1999). Essa técnica é baseada em padrões ('fingerprint') para classificar isolados bacterianos. O método de Rep-PCR utiliza iniciadores que hibridizam com sequências repetidas intergênicas (não codificantes) que são espalhadas por todo o genoma das bactérias (SABAT *et al.*, 2013). Os iniciadores, geralmente, possuem inosina em sua composição, nas regiões não conservadas, que têm a capacidade de se ligar com todas as bases nitrogenadas. Conforme a distribuição dos elementos de repetição no genoma, múltiplos padrões podem ser produzidos e,

após a amplificação, podem ser visualizados e caracterizados por eletroforese (SNELLING *et al.*, 1996).

Na técnica MLST (*Multilocus Sequence Typing*), genes codificadores de proteínas responsáveis pela manutenção da função celular, chamados genes de referência, são amplificados por PCR e sequenciados. Para cada gene de referência, as diferentes sequências presentes dentro de uma espécie bacteriana são atribuídas como alelos distintos e, para cada isolado, os alelos de cada um dos loci definem o perfil alélico ou tipo de sequência. Apesar de cara e trabalhosa, possui a principal vantagem de permitir a comparação de isolados de diferentes locais (SABAT *et al.*, 2013).

Independentemente do método utilizado, os métodos de tipagem molecular permitem a caracterização dos isolados em um determinado ambiente e auxiliam na tomada de decisões para evitar a disseminação dos clones multirresistentes.

OBJETIVOS

2.7 OBJETIVO GERAL

Rastrear, identificar e caracterizar geneticamente *Acinetobacter* spp. provenientes do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC), isolados de pacientes, profissionais da saúde e ambiente.

2.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar o perfil de resistência aos carbapenêmicos e à polimixina B de isolados de *Acinetobacter* spp. isoladas no HU/UFSC, provenientes de pacientes, profissionais da saúde e ambiente;
- b. Amplificar genes relacionados à resistência enzimática aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp.;
- c. Validar a metodologia Blue-Carba para avaliação fenotípica de isolados produtores de carbapenemases isoladas no HU/UFSC;
- d. Avaliar a distribuição clonal dos isolados de *Acinetobacter* spp.;
- e. Divulgar mensalmente os resultados obtidos ao HU/UFSC.

3 METODOLOGIA

3.1 BACTÉRIAS ISOLADAS

3.1.1 Projeto HAIMP

As amostras utilizadas nesse projeto de mestrado são provenientes de um projeto maior, intitulado “*Healthcare Associated Infections Microbiome Project*” (HAIMP). Esse projeto tem como objetivo o rastreamento, a identificação e a caracterização molecular de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar e possui várias instituições envolvidas: O Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), onde são realizadas as coletas; Laboratório de Microbiologia do HU-UFSC, onde foram feitas as identificações e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos; Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA), do departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSC (CCS-UFSC), coordenado pela Prof.^a Dr.^a Thaís Marques Sincero, do qual fazem parte os alunos de mestrado e doutorado envolvidos nesse projeto e local onde parte das atividades práticas foram realizadas; Laboratório de Protozoologia, localizado no departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da UFSC (MIP-CCB-UFSC), coordenado pelo Prof. Edmundo Carlos Grisard; e a empresa Neoprospecta Microbiome Technologies S/A, uma *start-up* de biotecnologia localizada no parque tecnológico Sapiens Parque em Florianópolis, SC, onde outra parte da metodologia foi realizada.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC (CEP-UFSC), sob o número 32930514.0.0000.0121 (Apêndice A). Os voluntários abordados durante a coleta, que aceitaram participar do estudo, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderam a um questionário com seus dados pessoais e informações sobre seu histórico médico. Quando se tratava de profissionais da saúde, havia, também, perguntas sobre a rotina do trabalho. No caso de

pacientes impossibilitados de se comunicar, como por exemplo, pacientes em coma, familiares puderam responder e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido dando a permissão para participar do estudo.

3.1.2 Coleta das amostras

As amostras utilizadas no projeto foram coletadas entre os meses de março a outubro de 2015, sendo que para o projeto HAIMP, foram coletadas até março de 2016. Todos os meses foram coletadas 180 amostras, com exceção do mês de outubro, no qual, houve redução para 95 amostras/mês. Para essa alteração foi levado em consideração o estudo feito dos resultados obtidos nos seis primeiros meses de coleta, retirando locais que não foram considerados relevantes e permanecendo os locais críticos que continuariam a ser monitorados. Após os 8 meses, obtiveram-se 1.355 amostras. Amostras do Complexo A. *baumannii-calcoaceticus* de pacientes isolados pelo setor de microbiologia do HU-UFSC também foram utilizadas durante o mesmo período de coleta, totalizando 1.430 amostras. Após o processo de identificação de todas as amostras (descrito posteriormente), para o presente trabalho de mestrado foram selecionados somente os isolados identificados como *Acinetobacter* spp.

Os setores escolhidos bem como as amostras a serem coletadas foram decididos juntamente com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do HU-UFSC, no projeto piloto que foi realizado em novembro de 2014. A coleta foi realizada em cinco setores do HU-UFSC: Unidade de terapia intensiva (UTI), Clínica médica I (CMI), Clínica cirúrgica I (CRI), Centro cirúrgico (CC) e Emergência (EMG). As amostras foram obtidas de pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar; a duração da coleta em cada mês foi de dois dias. Os pacientes estavam internados nos setores citados e foram escolhidos levando em consideração um tempo maior de internação, não importando se estavam com alguma infecção ou colonização. Como a participação é voluntária, nem sempre os

pacientes que participaram tinham maior tempo de internação. Os profissionais da saúde escolhidos consistiam nos que tinham contato direto com os pacientes: médicos, enfermeiros, técnicos de enfermagem, fisioterapeutas, farmacêuticos, nutricionistas e residentes de várias modalidades. No ambiente hospitalar, foram coletados dos leitos e banheiros dos pacientes, de salas de uso comum, como por exemplo, as salas de repouso médico e de enfermagem, sala de lanche, vestiário, sala de medicação, recepção, entre outros, além de equipamentos de uso comum, que são utilizados por mais de um paciente, como o raio X, ultrassom, carrinho de emergência, poltrona de fisioterapia, carinho de banho, carrinho de roupa limpa, entre outros. No quadro 1 podem ser vistos os pontos de coleta e a quantidade de amostras coletadas mensalmente nas cinco alas do hospital (CMI, CC, CRI, EMG e UTI).

Para a realização da coleta mensal no hospital, todos os participantes utilizaram paramentação específica, constituída de jaleco individual, toca, luvas, máscara, propé e jaleco descartável. O jaleco descartável e as luvas eram trocados a cada nova amostra a ser coletada e, principalmente, a cada coleta de paciente, estando ele em isolamento ou não.

Quadro 1: Pontos e sítios de coleta; e quantidade de amostras mensal e total coletadas entre março e outubro de 2015 no HU-UFSC, no âmbito do projeto HAIMP.

Pontos de coleta	Sítios coletados	Quantidade de amostras Mensal	Quantidade amostras Total
Pacientes	<i>Swab</i> retal	33 (30 em outubro)	261
	<i>Swab</i> nasal		
	<i>Swab</i> mãos		
Profissionais	<i>Swab</i> vestimenta	36 (18 em outubro)	270
	<i>Swab</i> mãos		
	<i>Swab</i> celular		
Ambiente Hospitalar	Leitos/quartos dos pacientes	111 (47 em outubro)	824
	Sala de lanche		
	Recepção		
	Prescrição		
	Repouso médico e enfermagem		
	Vestiários		
	Banheiros		
	Consultórios		
	Equipamentos de uso comum		
	Outros		
Amostras recebidas do laboratório		Variável	75
TOTAL		180 (95 em outubro)	1.430

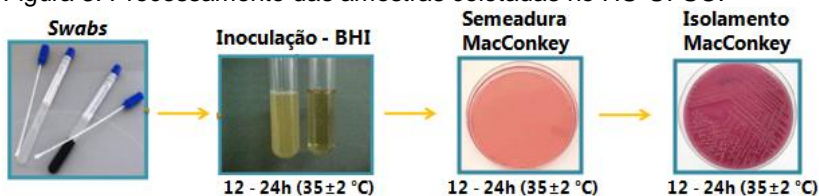
Fonte: da autora.

3.1.3 Processamento das amostras

Durante todo o período da coleta mensal, os *swabs* foram mantidos refrigerados em caixa térmica apropriada e com meio de transporte Amies (Copan). Após a coleta, os mesmos foram mantidos refrigerados por 48 horas antes de serem processados.

Após esse período, os *swabs* foram inoculados em tubos contendo caldo BHI (Brain-heart infusion – BD Difco™), um meio de cultura enriquecido não seletivo, e foram incubados por 12 a 24 horas, a $35\pm 2^\circ\text{C}$. Após esse período, as amostras foram semeadas por esgotamento em placas de ágar MacConkey (BD Difco™), específico para microrganismos Gram-negativos, e incubadas por 12 a 24 horas a $35\pm 2^\circ\text{C}$. As colônias com perfil fenotípico diferente foram re-isoladas em ágar MacConkey até que se conseguisse obter somente um tipo de colônia (Figura 3). Dependendo da amostra, eram observados de 1 a 3 isolados diferentes, e esses foram armazenados a -20°C em BHI com 15% de glicerol.

Figura 3: Processamento das amostras coletadas no HU-UFSC.



Os *swabs* foram inoculados em caldo BHI e incubados em estufa por 12-24h a $35\pm 2^\circ\text{C}$. Após esse período, $1\ \mu\text{L}$ do caldo BHI foi semeado em ágar MacConkey e as amostras incubadas por 12-24h a $35\pm 2^\circ\text{C}$. As colônias diferentes foram re-isoladas em ágar MacConkey até que se conseguisse somente um tipo de colônia em cada placa.

Fonte: da autora.

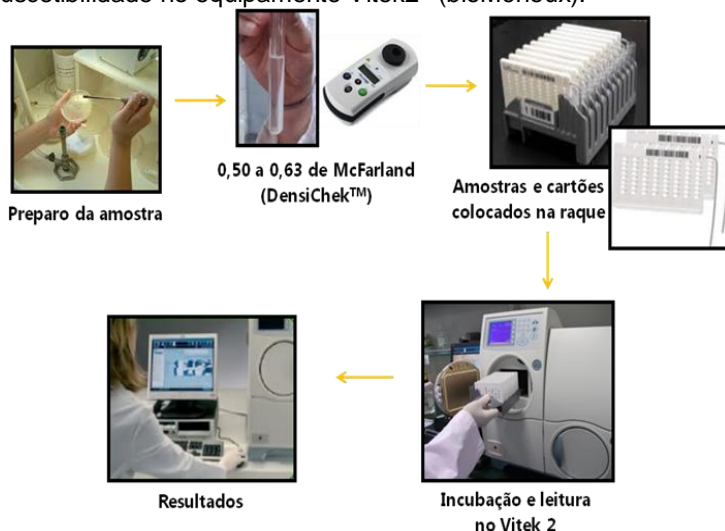
3.2 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.2.1 Identificação fenotípica dos isolados

Após o isolamento das bactérias em meio MacConkey, as mesmas foram identificadas pelo método automatizado Vitek2[®] (bioMérieux), no laboratório de Microbiologia do HU-UFSC. Os cartões do Vitek2[®] são compostos de 64 poços de crescimento, cada um com testes biológicos individuais para identificação bacteriana. O cartão utilizado para identificação das bactérias Gram-negativas foi o GN Test Kit, que contém 47 testes bioquímicos, os quais possuem substratos para detecção da utilização de fontes de carbono, atividades enzimáticas e de resistência além de um controle negativo. A detecção das atividades metabólicas se dá pela variação do pH, hidrólise enzimática e crescimento na presença de substâncias inibitórias.

A partir das placas de MacConkey, que continham os isolados de cada amostra coletada, foi procedida a identificação pelo Vitek2[®]. Com alças estéreis, uma quantidade suficiente de colônias para a obtenção de uma suspensão entre 0,5 e 0,63 da escala de McFarland, foi ressuspensa em tubos de poliestireno contendo 3 mL de salina estéril (0.45% NaCl), a solução foi ajustada de acordo com a escala de McFarland utilizando o aparelho DensiChekTM (~10⁸ UFC/ml). Os tubos contendo a suspensão de cada bactéria foram colocados em raques próprias do aparelho e, em cada amostra foi colocado um cartão de identificação (GN Test Kit), através de um sistema a vácuo a suspensão é distribuída em todos os poços do cartão de identificação e estes são incubados a 37°C. A cada 15 minutos o cartão é submetido à leitura cinética de fluorescência durante todo período de incubação e o resultado se dá em aproximadamente 10 horas (Figura 4). Os resultados são comparados com um banco de dados do aparelho e são visualizados no próprio equipamento (BIOMÉRIEUX, 2006; PINCUS, 2013).

Figura 4: Processamento das amostras para identificação e avaliação da suscetibilidade no equipamento Vitek2® (bioMérieux).



As amostras são inoculadas em salina estéril e por meio do DensiChek ajustadas ente 0,5 e 0,63 da escala de McFarland. Os tubos e os respectivos cartões de identificação ou AST são colocados na raque e incubados no aparelho. Após leitura, os resultados são visualizados e analisados no computador através do programa do Vitek2®.

Fonte: da autora.

3.2.2 Identificação genotípica dos isolados

Outro método de identificação utilizado para determinação da espécie foi o sequenciamento, no qual se utilizou o gene 16S rDNA como marcador. A técnica empregada foi a de sequenciamento de nova geração conhecida como NGS (Next Generation Sequencing) por meio da plataforma MiSeq Sequencing System (Illumina, Inc) com o Kit MiSeq Reagent Kit v2 (single-end reads 1 x 300pb). Essa etapa foi realizada na empresa Neopropecta.

3.2.2.1 Extração de DNA

O mesmo método de extração de DNA foi utilizado para identificação genotípica e para detecção dos genes de

resistência (item 4.4). O DNA microbiano foi extraído utilizando *beads* magnéticas através de protocolo desenvolvido na empresa Neoprosecta.

A quantificação do DNA foi feita por detecção fluorométrica realizada pelo sistema Qubit[®] utilizando o kit comercial Qubit[®] dsDNA BR Assay (Invitrogen), no qual se utiliza corantes fluorescentes para medir a concentração de biomoléculas de interesse, obtendo-se resultados precisos, mesmo com baixa concentração de DNA e mais acurados, pois detecta somente a molécula de interesse.

Para a preparação da amostra a ser quantificada, todo procedimento é realizado no escuro. Um mix é preparado com 199 μL do Qubit Buffer e 1 μL do Qubit Reagent, para cada amostra e, também, para dois padrões (Standard 1 e 2). Para cada amostra foi utilizado um microtubo de 0,5 mL específico para quantificação no qual foram adicionados 198 μL no mix preparado e 2 μL do DNA, e para cada padrão, foi utilizado 190 μL do mix e 10 μL do padrão. Os tubos foram agitados em vórtex e deixados à temperatura ambiente no escuro por 2 a 5 minutos. No aparelho, primeiramente são lidos os dois padrões e, em seguida, as amostras. Após quantificação, os DNAs foram diluídos para 0,5 ng/ μL e mantidos a -20°C para posterior utilização.

3.2.2.2 Identificação genotípica

O sequenciamento para identificação genotípica consiste em vários passos, entre eles: extração de DNA (tópico 3.2.2.1), preparo das bibliotecas, purificação das bibliotecas, quantificação das bibliotecas por qPCR (PCR em tempo real), sequenciamento, análise computacional e publicação dos resultados na plataforma Epiome.

O primeiro passo do sequenciamento, após a extração do DNA das amostras, consiste no preparo das bibliotecas de DNA em que são inseridos adaptadores, que são sequências artificiais conhecidas, as quais serão ligadas em pequenos fragmentos de DNA. Para isso, foi realizado o isolamento e amplificação da região de interesse do DNA, a região V3-V4 do gene ribossomal

16S por meio de iniciadores específicos e posterior incorporação dos adaptadores. Todas as amostras foram feitas em triplicatas, inclusive o controle negativo e positivo da reação.

As triplicatas de cada amostra foram unidas formando as bibliotecas de cada amostra e purificadas, a fim de remover os resíduos de iniciadores, dNTPs e reagentes de reação que pudessem interferir no sequenciamento.

Após esse processo, a biblioteca estava pronta para ser quantificada pelo Qubit (item 4.2.2.1) e por qPCR, para que a quantidade absoluta de produto de amplificação das bibliotecas fosse o mais preciso possível. Por qPCR, o método utilizado foi o de curva padrão (PCR em Tempo Real 7500 Fast - Life Technologies), no qual a quantificação é realizada pela interpolação dos valores de C_q (cycle quantification) encontrados para as diluições da biblioteca, com os C_qs da curva padrão (DNA padrão com quantidades conhecidas).

Para realização do sequenciamento, a biblioteca precisa estar em uma concentração adequada, de acordo com o Kit a ser utilizado. Após a adequação da molaridade, a biblioteca foi desnaturada utilizando temperatura e NaOH. Do *pool* a 12pM foram pipetados 600 µL no cartucho de sequenciamento, esse e os demais reagentes foram colocados no aparelho e se iniciou o sequenciamento.

Os dados do sequenciamento foram enviados automaticamente aos servidores da Neopropecta para análise. As sequências resultantes do sequenciamento do 16S rDNA foram passadas por um filtro de qualidade, utilizando o “*Phred Quality Score*” de 30 e as últimas bases sequenciadas, quando tinham um valor <30, foram descartadas. Também foram removidos os adaptadores da tecnologia Illumina por meio de métodos biocomputacionais.

Por meio de análises de bioinformática, as sequências foram utilizadas para identificação genotípica das espécies bacterianas por meio da comparação com um banco de dados de 16S rDNA. Esse banco é baseado no NCBI – National Center for Biotechnology Information. Essa etapa foi realizada pela equipe

de bioinformática da empresa Neopropecta e o resultado foi visualizado no software Epiome.

3.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

O perfil de suscetibilidade dos isolados também foi realizado utilizando o equipamento automatizado Vitek2[®]. O procedimento para realização do TSA é exatamente o mesmo feito para a identificação. A partir da suspensão em salina (escala entre 0,50 a 0,63 de McFarland) que foi utilizada para a identificação, 45 µL foram adicionados a um novo tubo com 3 mL de salina, e essa nova suspensão foi colocada no cartão AST N239. Geralmente já se coloca na mesma raque o tubo para identificação da bactéria e ao seu lado o tubo para o TSA com seus respectivos cartões.

Da mesma forma que na identificação, a suspensão também é preenchida no cartão pelo sistema de vácuo e incubada juntamente com o cartão AST no aparelho. A leitura de cada poço contendo o antimicrobiano também é feita a cada 15 minutos até que termine a incubação. O sistema avalia o padrão de crescimento de cada bactéria na presença de antimicrobianos, comparando com o crescimento do poço controle, com isso, o aparelho fornece uma estimativa calculada do MIC (Concentração Inibitória Mínima) e libera o resultado classificando a bactéria como suscetível, resistente ou com resistência intermediária para cada antimicrobiano testado (Figura 4). O resultado é liberado com base nos comitês internacionais, como por exemplo, o CLSI (BIOMÉRIEUX, 2006; PINCUS, 2013).

Para a classificação dos isolados, foram seguidos os critérios do ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), os quais classificam como MDR (Multidrug resistant) isolados que são resistentes a um ou mais agentes, de três ou mais classes de antimicrobianos; como XDR (Extensive Drug Resistant) os isolado resistentes a um ou mais agentes de todas as classes de antimicrobianos, com exceção de uma ou duas

classes, e PDR (Pandrug Resistant) quando os isolados são resistentes a um ou mais agentes pertencentes a todas as classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

3.4 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS

3.4.1 Amplificação gênica por PCR

Para a detecção dos genes de resistência que codificam para carbapenemases foi utilizada a técnica de PCR em tempo real ou quantitativo (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real – qPCR), por meio de ensaios multiplex utilizando o equipamento 7500 Fast - Life Technologies. Os genes pesquisados foram: *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-72-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES}, *bla*_{CTXM-1}, *bla*_{CTXM-2}, *bla*_{CTXM-8}, *bla*_{CTXM-9}. Para o ensaio de qPCR foram usadas sondas de hidrólise e iniciadores desenvolvidos pela empresa Neopropecta. O volume final da reação foi 10 µL utilizando o Kit Rgene. As concentrações dos reagentes foram padronizadas e a ciclagem de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos, 35 ciclos de 95°C por 15 segundos a 90°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos e a leitura da fluorescência foi feita na extensão. Todas as amostras foram feitas em triplicata, incluindo controles negativo e positivo.

Para a padronização da qPCR foram seguidos alguns critérios para classificação das amostras como positivas ou não para os genes de resistência:

- Quando o Cq foi menor ou igual a 30 em pelo menos 2 repetições: POSITIVO
- Sem amplificação: NEGATIVO
- Amplificação/ruído abaixo do *Threshold*: NEGATIVO
- Ruído alto e contínuo, a partir dos primeiros ciclos: NEGATIVO

Quando Cq foi maior que 30 em duas ou mais replicatas, a amostra foi repetida e um gel de eletroforese foi feito com o produto da amplificação para visualização da banda de interesse. O resultado foi interpretado segundo alguns critérios:

- Cq maior que 30 em pelo menos duas replicatas e gel sem banda: NEGATIVO

- Cq maior que 30 em pelo menos duas replicatas e gel com banda: POSITIVO

Após análises dos resultados seguindo esses critérios, foi escolhido o Cq de 33.

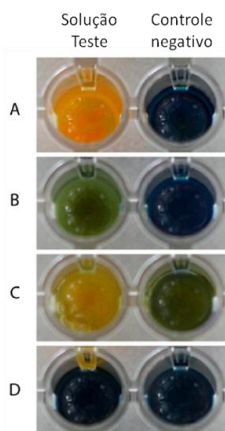
3.5 AVALIAÇÃO DO TESTE BLUE-CARBA PARA DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES

Para avaliação da presença ou não de carbapenemases (detecção fenotípica) através de um teste considerado rápido, foi utilizada a metodologia de Blue-Carba (PIRES *et al.*, 2013).

Cada amostra testada foi semeada em placas de ágar Mueller-Hinton (Merck Millipore) e, com uma alça de 10 µL totalmente preenchida, foi ressuspensa em dois poços de uma microplaca, contendo no primeiro poço (controle negativo) 100 µL da solução de controle negativo e, no segundo (teste), 100 µL da solução teste. Cada amostra possui seu respectivo controle negativo que é composto por uma solução de 0.04% de azul de bromotimol (ACS. Reag. PH Europeia - VETEC), pH 7.0. Essa solução de controle negativo foi preparada para controlar a influência dos produtos ou componentes das bactérias no pH da solução. A solução teste é composta pela solução 0.04% de azul de bromotimol ajustada para pH 6,0, adicionada de 0,1 mmol/L de ZnSO₄ (sulfato de zinco heptahidratado, Sigma Aldrich) e 3 mg/mL de imipenem (European Pharmapeia Reference Standart) com um pH final de 7,0. A placa com os testes e seus respectivos controles negativos, foi incubada a 35±2°C durante duas horas sob agitação constante. No teste, a atividade da carbapenemase foi detectada pela alteração de cor da solução de azul de bromotimol (azul para verde/amarelo), resultante da hidrólise do imipenem em um derivado carboxílico, diminuindo o

pH. Os resultados do teste Blue-Carba foram interpretados como se segue: quando o teste e o controle negativo, respectivamente, forem: amarelo versus azul, amarelo versus verde e verde versus azul, caracteriza uma bactéria positiva para produção de carbapenemase, enquanto que uma bactéria não produtora de carbapenemase apresentará solução verde ou azul em ambas as soluções (controle negativo e teste). Exemplificado na figura 5 (modificada de (PIRES *et al.*, 2013)), resultados positivos e negativo para produção de carbapenemase, (PIRES *et al.*, 2013).

Figura 5: Resultados representativos do teste Blue-Carba.



Letras A, B e C representam testes positivos para produção de carbapenemase, letra D, teste negativo. Fonte: modificada de (PIRES *et al.*, 2013).

3.6 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO CLONAL DOS ISOLADOS POR REP-PCR

3.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA para utilização na técnica de Rep-PCR foi feita a partir de culturas frescas (máximo de 24 horas desde sua semeadura) das bactérias que foram mantidas a -20°C. Com uma alça estéril de 1 µL totalmente preenchida, as colônias

foram selecionadas e diluídas em 400 µL de tampão de extração TES (Tris-HCl 1 M pH 8,0, EDTA 0,5 M pH 8,0, SDS 20%) e fervidas em banho-maria por 10 minutos. Em seguida foram adicionadas proteinase K e RNase e incubadas em banho-maria por 1 hora a 42°C. Após incubação foram adicionados 84 µL de NaCl (6 M) e os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 1.100 xg por 5 minutos. O sobrenadante (aprox 350 µL) foi transferido para outro microtubo, com o devido cuidado para que não houvesse contaminação com o sedimento formado. Então, foram adicionados 700 µL de álcool absoluto gelado e centrifugado a 1.100 xg por 2 minutos. O etanol absoluto foi descartado e o sedimento lavado duas vezes com 1.000 µL de etanol 70% gelado e posterior centrifugação a 1.100 xg por 1 e 5 minutos em cada lavagem, respectivamente. Novamente o sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos em estufa a 60°C para secagem do DNA. O sedimento formado foi então ressuspensionado em 150 µL de água ultrapura livre de DNases e RNases.

O DNA foi quantificado por espectrofotometria a 260nm, em equipamento NanoVue Plus (GE- General Electric) e, posteriormente, diluído na concentração de 50 ng/µL. A integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% e a pureza por espectrofotometria pela relação 260/280nm e 260/230nm.

3.6.2 Rep-PCR

A variabilidade genética dos isolados foi identificada por meio da técnica de Rep-PCR. O ensaio de PCR foi realizado com os iniciadores Rep1R-I (5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3') e Rep2-I (5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3') (MOHAPATRA *et al.*, 2007; VERSALOVIC *et al.*, 1991). As concentrações dos reagentes (Platinum® Taq DNA Polymerase - Invitrogen) foram padronizadas e a reação foi feita em um volume final de 10 µL contendo Buffer 10x KCl (1x), MgCl₂ (3mM), dNTPs (0,2 mM), iniciadores (2 µM), Taq DNA polimerase (1 U) e DNA (50 ng/µL). A ciclagem de amplificação foi realizada sob as seguintes

condições: desnaturação inicial a 95°C, durante 3 minutos, 30 ciclos de 90°C por 30 segundos, a 40°C durante 1 minuto e 65°C durante 8 minutos, e um alongamento final a 65°C durante 8 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%), com corrida de 3 horas e 40 min a 80V em tampão TBE (Tris 89 mM, Borato 89 mM, 2 mM EDTA) e, posteriormente, foram corados com brometo de etídio (1 µg/mL), visualizados em transiluminador e fotografados. O padrão de tamanho molecular utilizado foi de 100 bp (Invitrogen).

O perfil gerado pela eletroforese foi analisado segundo critérios de Tenover *et al.* (1995), que compara os isolados com o padrão mais prevalente entre todos e classifica em 4 categorias: “indistinguível”, quando o isolado é idêntico ao isolado mais prevalente não tendo nenhuma diferença no número de bandas; “intimamente relacionados,” quando possui somente um evento genético como uma mutação, inserção ou deleção do DNA diferindo em duas ou três bandas, esse tipo de evento pode ocorrer quando algumas espécies são cultivadas muitas vezes ou isoladas várias vezes do mesmo paciente; “possivelmente relacionado”, quando difere em quatro ou seis bandas, que pode ocorrer por dois eventos genéticos como uma inserção, deleção, ganho ou perda de sítio de restrição, esse tipo de variação é observado entre isolados que são coletados por um longo período de tempo (mais de 6 meses) ou obtidos de um grande número de pacientes que estão envolvidos em um surto de longa duração, esses isolados podem diferir por outras técnicas como tipagem de plasmídeo; e quando um isolado é “não relacionado”, seus padrões diferem em mais de sete bandas, sendo menos de 50% similar ao isolado mais prevalente, podendo ter tido 3 ou mais eventos genéticos. Essa classificação é demonstrada na tabela 1 (TENOVER *et al.*, 1995).

Tabela 1: Critério de interpretação dos padrões de PFGE segundo (TENOVER *et al.*, 1995)

Classificação	Nº de eventos genéticos	Nº de bandas diferentes	Interpretação
Indistinguíveis	0	0	Isolado é parte de um surto
Intimamente relacionados	1	2-3	Isolado é provavelmente parte de um surto
Possivelmente relacionados	2	4-6	Isolado é possivelmente parte de um surto
Não relacionados	≥3	≥7	Isolado não faz parte de um surto

Os perfis eletroforéticos também foram analisados visualmente e a presença ou ausência de bandas foram representadas por um genótipo binário, no qual 0 (zero) significava ausência de banda e 1 a presença. Por meio de análise computacional, uma matriz de distância foi gerada através do programa DendroUPGMA (GARCIA-VALLVÉ, 2016) e os percentuais de similaridade foram atribuídos pelo Coeficiente de Dice. A posterior construção dos dendogramas foi realizada pelo programa MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013) a partir da matriz que foi gerada, utilizando o modelo matemático UPGMA (unweighted Pair Group Method).

3.7 RESULTADOS REPORTADOS PARA O HOSPITAL

Todos os resultados obtidos pelas coletas foram reportados diretamente para a CCIH por meio do software Epiome, em que os resultados do sequenciamento de cada amostra podiam ser visualizados. No software, os resultados são vistos de várias maneiras, na forma de Perfil Microbiológico, no qual cada amostra pode ser visualizada individualmente, mostrando quais bactérias foram encontradas através do sequenciamento do 16S rDNA; a opção de Mapa de Risco, onde as amostras são plotadas em uma planta baixa de cada ala coletada do hospital, e os pontos mais críticos são evidenciados;

e também na forma de Perfil Genético, em que as amostras são agrupadas em clusters de similaridade baseada no 16S.

Toda a equipe de coleta ficou à disposição das equipes das alas onde foram feitas as coletas e conforme disponibilidade das equipes, reuniões foram feitas para apresentação dos resultados, dos pontos mais críticos encontrados, das resistências das bactérias e quais as medidas de controle e prevenção que poderiam ser tomadas para que esses dados mudassem a cada nova coleta.

A empresa Neopropecta e nossa equipe de coleta ficaram à disposição para coletar alguns pontos específicos caso o Hospital tivesse suspeita de alguma contaminação. Alguns testes para avaliar o modo como era feita a limpeza do hospital também foram realizados em alguns locais, como na sala de lanche e leito da UTI.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Acinetobacter spp., principalmente *A. baumannii*, tem se destacado como um importante patógeno causador de infecções nosocomiais em todo o mundo devido sua habilidade de sobreviver por longos períodos em superfícies e pela capacidade de adquirir resistência a várias classes de antimicrobianos. Por se tratar de uma bactéria oportunista, causa diversas infecções em pacientes hospitalizados que estão mais suscetíveis. Possuem grande capacidade de aderência em superfícies inanimadas, como por exemplo, os materiais e equipamentos utilizados nos hospitais, facilitando assim, a sua disseminação causando surtos.

Devido a essas informações e ao conhecimento de alguns surtos ocorridos no HU/UFSC, o presente projeto realizou o rastreio, a identificação e a caracterização de *Acinetobacter* spp. isolados do ambiente, de pacientes e de profissionais da saúde no HU-UFSC.

Ao longo de oito meses (março a outubro de 2015) foram coletadas 1.355 amostras (*swabs*) provenientes de cinco alas do hospital: UTI, EMG, CC, CRI e CMI, além de amostras recebidas do laboratório de microbiologia do HU/UFSC (75 amostras), totalizando 1.430 amostras.

4.1 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DAS ESPÉCIES

Das 1.430 amostras, foram isoladas 575 bactérias distintas. Dos isolados, analisadas fenotipicamente no Vitek2[®], 135 foram identificadas como Complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, três como *A. Iwoffii* que foi encontrado somente no ambiente, e duas como *A. radioresistens*, um do ambiente e outro das mãos de um paciente, totalizando 140 (24,3%) isolados pertencentes ao gênero *Acinetobacter* spp. Os outros 75,7% foram identificados em sua maioria como enterobactérias em menor número *Pseudomonas* spp. e outras espécies. Para esse trabalho foram utilizadas somente amostras de *Acinetobacter* spp.

A identificação dos isolados foi feita por duas metodologias diferentes, uma pelo método fenotípico tradicional, utilizando o equipamento Vitek2[®], e a outra por meio do sequenciamento do 16S rDNA.

Os equipamentos automatizados e testes manuais que utilizam métodos fenotípicos para identificação não conseguem fazer a distinção das espécies dentro do Complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, essa identificação somente é possível por meio de ferramentas moleculares (PAILHORIE *et al.*, 2015). Uma alternativa bastante utilizada é o sequenciamento do 16S rDNA.

Todas as 140 amostras foram submetidas ao sequenciamento do 16S rDNA, porém, devido a um problema no sequenciamento que comprometeu a identificação, as amostras do mês de março não foram identificadas genotipicamente a nível de espécie, mas foram mantidas pois apresentam resultados importantes que serão abordados posteriormente. Com isso, 131 isolados dos 140 foram sequenciados.

Em se tratando de gênero, somente duas amostras das 131 não apresentaram o mesmo resultado do que foi identificado pelo Vitek2[®], sendo identificadas como *Pseudomonas putida*, com isso, em nosso trabalho obtivemos 98,6% de concordância em relação ao gênero.

Com relação à espécie, o sequenciamento do 16S conseguiu distinguir as espécies do Complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*. Levando em consideração o maior número de sequências encontrado para cada amostra, das 131 amostras sequenciadas obtivemos então, uma nova identificação: 101 *A. baumannii* (77%), oito *A. calcoaceticus* (6,1%), sete *A. pittii* (5,3%), seis *A. soli* (4,5%), cinco *A. radioresistens* (3,8 %), um *A. nosocomialis*, um *A. bereziniae*, uma *Pseudomonas putida* e uma *Pseudomonas mendocina*. No quadro 2, pode-se visualizar a comparação da identificação feita pelo Vitek2[®] e pelo sequenciamento do 16S.

Quadro 2: Identificação das 131 espécies pelo Vitek2[®] e pelo sequenciamento do 16S rDNA.

Identificação da Espécie	
Vitek2 [®]	Sequenciamento 16S rDNA
Complexo <i>A. baumannii-calcoaceticus</i> (126)	<i>A. baumannii</i> (101) <i>A. calcoaceticus</i> (8) <i>A. pittii</i> (7) <i>A. Soli</i> (6) <i>A. radioresistens</i> (1) <i>A. nosocomialis</i> (1) <i>P. putida</i> (1) <i>P. mendocina</i> (1)
<i>A. lwoffii</i> (3)	<i>A. radioresistens</i> (2) <i>A. bereziniae</i> (1)
<i>A. radioresistens</i> (2)	<i>A. radisoresistens</i> (2)

Fonte: da autora.

Já se tem o conhecimento que existem alguns problemas em relação à identificação do gênero e espécie por meio da análise do 16S rDNA. Essas discrepâncias podem ser devido a espécies que possuem uma elevada semelhança na sequência do 16S, em alguns casos a diferença é de apenas 0,5%, tendo 99,5% de similaridade. Problemas com a nomenclatura de uma única espécie ou daquelas que possuem complexos, como é o caso do *Acinetobacter* spp., e sequências com erros depositadas no banco de dados também podem comprometer a análise (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; JANDA; ABBOTT, 2007). Recentemente, erros na preparação das bibliotecas também têm sido citados (D'AMORE *et al.*, 2016).

Por ser uma técnica baseada em PCR, ela pode ter alguns vieses relacionados com a especificidade incompleta, cobertura incompleta e desenho de iniciadores (SANSCHAGRIN; YERGEAU, 2014). Porém, esses e outros vieses citados, acontecerão caso todos os cuidados necessários não tenham sido tomados para serem evitados, como o desenho correto e específico de iniciadores em regiões conhecidas e amplamente utilizadas para identificação, como é o caso das regiões V3 e V4 que foram utilizadas nesse estudo. Durante a padronização e

validação da técnica, nosso grupo de pesquisa detectou que se tomados os devidos cuidados que essa técnica exige em toda sua execução, o principal fator que pode alterar o resultado da identificação pelo sequenciamento do 16S, seria a qualidade do banco de dados usado para comparação, devido à sequências que foram depositadas com erros.

Alguns trabalhos mostram uma taxa de 65-100% de acerto na identificação das espécies utilizando o 16S rDNA, e uma taxa de 20-85% utilizando métodos automatizados em geral e métodos manuais. Isso varia conforme o tipo de bactéria a ser analisado, sendo que micobactérias e anaeróbios apresentam as menores taxas. Para os não fermentadores, como *Acinetobacter* spp., a taxa de acerto é em torno de 91% (BOSSHARD *et al.*, 2006; FONTANA *et al.*, 2005; JANDA; ABBOTT, 2007; LAU *et al.*, 2006). Para bactérias que possuem problemas na identificação utilizando o 16S rDNA, a recomendação é a utilização de outros genes, como o rpoB (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; JANDA; ABBOTT, 2007).

4.2 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL DOS ISOLADOS

A UTI foi o local onde foi encontrado o maior número de amostras positivas para *Acinetobacter* spp., com 18 isolados durante os oito meses coletados, seguida da CMI (8), que é uma ala de isolamento, EMG (7), CC (5) e CRI (3). Dos outros locais coletados, as salas de lanche de todas as alas (11) (mesa, bancadas e eletrodomésticos) e o leito dos pacientes foram os locais mais contaminados (13). As grades dos leitos dos pacientes, a parede onde se encontram os gases, como oxigênio, e o suporte de soro foram os mais afetados (5 e 4 isolados respectivamente). Equipamentos de uso comum e salas de repouso médico/enfermagem também apresentaram amostras positivas (6 e 5 amostras, respectivamente).

Os equipamentos que se destacaram, e que chamam a atenção pela gravidade de se encontrar bactérias nesses locais e por serem compartilhados entre todos os pacientes, foram o

carrinho de roupa limpa, que era usado nos leitos para a troca dos pacientes após o banho, o raio-x, a poltrona de fisioterapia e o passante. A distribuição espacial e temporal dos isolados pode ser melhor observada no quadro 3.

Quadro 3: Distribuição espacial e temporal dos isolados de *Acinetobacter* spp. no HU-UFSC.

TOTAL	MÊS									TOTAL
	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro		
Amostras	187	181	186	186	199	202	194	95	1430	
Coletadas no HU-UFSC	180	180	180	180	180	180	180	95	1355	
<i>Ambiente</i>	111	111	111	111	111	111	111	47	824	
<i>Paciente</i>	33	33	33	33	33	33	33	30	261	
<i>Profissionais da saúde</i>	36	36	36	36	36	36	36	18	270	
Proveniente do Laboratório de microbiologia	7	1	6	6	19	22	14	0	75	
Cepas isoladas (coleta+lab microbiologia)	69	74	59	76	83	81	80	53	575	
<i>Acinetobacter</i> spp.	16	9	9	17	23	30	27	9	140	
Complexo <i>A. baumannii-calcoaceticus</i>	16	9	9	16	22	29	26	8	135	
<i>Acinetobacter</i> spp. (Ambiente*)	5	6	0	6	5	6	8	5	41	
CMI	1	2	0	0	2	2	1	0	8	
CRI	0	0	0	0	0	0	3	0	3	
CC	0	1	0	1	1	2	0	0	5	
UTI	4	2	0	3	1	0	4	4	18	
Emg	0	1	0	2	1	2	0	1	7	
*Ambientes										
<i>Sala lanche</i>	2	0	0	3	1	2	2	1	11	
<i>Sala de recuperação cirúrgica</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
<i>Equipamento de uso comum</i>	1	1	0	1	0	0	2	1	6	
<i>Leito de pacientes</i>	2	4	0	1	1	1	1	3	13	
<i>Vestiário</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	2	
<i>Prescrição</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	2	
<i>Repouso Enfermagem/médico</i>	0	0	0	0	2	2	1	0	5	
<i>Consultório médico</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
<i>Acinetobacter</i> spp. (Paciente**)	10	2	8	9	18	24	17	4	92	
Swab mãos	1	0	0	1	1	0	1	2	6	
Swab nasal	1	0	1	1	0	1	2	2	8	
Swab retal	3	2	3	3	8	14	6	0	39	
Secreção traqueal	4	0	3	4	6	7	7	0	31	
Outros sítios anatômicos	1	1	0	0	3	2	1	0	8	
** Paciente										
<i>Sexo Feminino</i>	4	1	2	4	6	7	6	1	31	
<i>Sexo Masculino</i>	2	1	2	3	9	13	6	1	37	
<i>Média da idade</i>	62	63	59	58	58	56	57	74	60	
<i>Acinetobacter</i> spp. (Profissionais da saúde)	1	1	1	2	0	0	2	0	7	
Mãos	0	0	1	1	0	0	2	0	4	
Celular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Vestimenta	1	1	0	1	0	0	0	0	3	

**= Ambientes: sala de lanche, sala de recuperação cirúrgica, equipamento de uso comum, leito de pacientes, vestiário, prescrição, repouso enfermagem/médico, consultório médico.

***= Paciente: sexo feminino, sexo masculino, média da idade.

Fonte: da autora

Acinetobacter spp. tem uma grande capacidade de formação de biofilme, que facilita a adesão da bactéria em superfícies como os materiais utilizados em ambientes hospitalares. Além dos citados em nossa coleta, podem se aderir também em cateteres e tubos de ventilação mecânica, facilitando a infecção e colonização dos pacientes (MARTINS, 2013; VAN DEN BROEK *et al.*, 2006; ZARRILLI, 2016). Alguns trabalhos também citam isolados em equipamentos como raio-x, bancadas, ventiladores, leitos e sistemas de circulação de ar (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; VAN DEN BROEK *et al.*, 2006).

Um dos meios mais comuns de transmissão de bactérias para os pacientes é por meio das mãos dos profissionais da saúde (DIJKSHOORN *et al.*, 2007). Foram encontradas sete amostras positivas entre os profissionais da saúde, sendo que as mãos foram o sítio mais prevalente, seguido da vestimenta. Entretanto, provavelmente pela capacidade de formação de biofilmes, parece que o ambiente desempenha um papel mais importante na disseminação de *Acinetobacter* spp. no HU-UFSC.

Uma vez infectado/colonizado, o paciente pode carregar a bactéria em diferentes partes do corpo por dias ou até semanas, podendo ser uma fonte de contaminação. Dentre os 261 pacientes coletados mais as 75 amostras provenientes do laboratório de microbiologia, 92 *Acinetobacter* spp. foram isolados, ou seja, 27,3 % dos pacientes que participaram do estudo estavam infectados ou colonizados, sendo possivelmente reservatórios e fontes de disseminação da bactéria. A média de idade dos pacientes foi de 60 anos. Dos 92 isolados, 70 eram de pacientes da UTI (76%), corroborando com estudos que mostram que as taxas de infecção hospitalar em unidades de terapia intensiva são maiores que nas demais alas (ALBERTI *et al.*, 2002; MACVANE, 2016; MAGILL *et al.*, 2014), principalmente devido aos pacientes estarem mais debilitados e susceptíveis. Um estudo multicêntrico constatou que as taxas de infecção em pacientes de UTIs podem variar de 2,3% a 49,2% (ALBERTI *et al.*, 2002); outro acompanhou 66 pacientes com *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos de uma unidade de terapia

intensiva por 30 dias e a taxa de mortalidade foi de 47% (PRATES *et al.*, 2011).

Durante a coleta, no final do mês de junho até setembro, o hospital sofreu um surto de *Acinetobacter* spp. que se disseminou por várias alas, refletindo em uma maior quantidade de isolados, em sua maioria da UTI. Sabe-se que surtos de *Acinetobacter* spp. possuem uma variação sazonal e se dão principalmente no verão, pois o calor e umidade facilitam a proliferação da bactéria (MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008; PELEG *et al.*, 2008). O surto em questão aconteceu nos meses de inverno, porém o ano de 2015 foi atípico e as temperaturas estavam mais altas que o registrado normalmente, com máxima de 21,7°C e mínima de 15,2°C segundo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

4.3 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O TSA foi feito através do sistema automatizado Vitek2[®] e os 140 isolados de *Acinetobacter* spp. foram divididos em 24 perfis fenotípicos de resistência, sendo que um teve maior prevalência (n=38) (Tabela 2). Os perfis se repetem mesmo que sejam considerados somente o resultado qualitativo do TSA.

Sete amostras foram testadas manualmente para confirmação, pois, apesar de serem sensíveis aos carbapenêmicos, apresentaram genes de carbapenemases. Nesta confirmação, uma amostra foi resistente no teste manual (Perfil 18).

A maioria dos laboratórios de microbiologia clínica utilizam sistemas automatizados como o principal método de teste de suscetibilidade por causa de sua eficiência e conveniência. Os mais utilizados são o Vitek2[®], da bioMérieux, o Microscan Walk-Away[®], da Dade International e Phoenix[™], da BD Diagnostic Systems. Esses sistemas permitem a execução dos testes com maior rapidez comparados com os manuais e fornecem resultados semiquantitativos (JORGENSEN; FERRARO, 2009). Entretanto, algumas desvantagens dos sistemas automatizados devem ser consideradas: são sistemas onerosos para pequenas

rotinas, não fornecem valores exatos da CIM (exceto PhoenixTM), mas, principalmente, realizam um período de incubação curto, o que favorece com que bactérias com mecanismos de resistência induzíveis apresentem falsa suscetibilidade.

Alguns estudos relataram taxas de erros na determinação da suscetibilidade por esses métodos quando comparados com microdiluição em caldo. Esses erros são classificados em erros muito graves (VRE – Very Major Errors) quando é reportado suscetível no lugar de resistente, erros graves (ME- Major Errors), quando reportado resistente sendo suscetível e erros menores (mE – minor Errors) onde é reportado resistência intermediária quando é suscetível ou resistente (ABBOTT *et al.*, 2013). Em um estudo que comparou o resultando de três equipamentos automatizados, Vitek2[®], Phoenix e Microscan, com o CLSI, as taxas de erros (VRE) variam de 0,9-3,7% para imipenem e 0-1,9% para meropenem. Comparando com o EUCAST as taxas são maiores, 25,2% para imipenem e 17,8-18,7% para meropenem. O Microscan foi o que apresentou mais erros em comparação com os outros dois equipamentos. (MARKELZ *et al.*, 2011). Outro trabalho também comparou os mesmos equipamentos e as taxas de erros para o Microscan também foram maiores com 28% de erros muito graves (VRE) (KULAH *et al.*, 2009). Dessa forma, resultados duvidosos entre os antimicrobianos devem sempre ser confirmados por algum teste manual, como por exemplo, o teste de disco difusão e lidos conforme recomendação padronizada vigente (BRCAST, 2016; CLSI, 2015).

Tabela 2: Fenótipos obtidos avaliando-se os perfis de resistência aos antimicrobianos dos 140 isolados de *Acinetobacter* spp. e número de isolados de cada gene de resistência para cada fenótipo. O fenótipo 1 foi utilizado como referência por ser o mais abundante.

CLASSE	Aminoglicosídeos		Penicilina	Penicilina + inibidor	Cefalosporinas II			Cefalosporinas III		Cefalosporinas IV	Fluoroquinolonas	Carbapenênicos		Gliciliclinas	Polimixinas	Genes de Resistência detectados (nº de isolados)	
	Antimicrobiano	AMI	GEN	AMP	AMS	FOX	CXM	CXMa	CAZ	CRO	CPM	CIP	IMP	MER	TGC		COL
FENÓTIPO	1 (n=38)	16S	2S	≥32R	16I	≥64R	≥64R	≥64R	≥64R	≥64R	≥64R	≥4R	≥16R	≥16R	2S	≤0,5S	OXA-23 (38), OXA-51 (38), CTXM8 (1)
	2 (n=17)	8S	≥16R	-	≥32R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤0,5S	-	OXA-23 (17), OXA-51 (17)
	3 (n=8)	≤2S	≤1S	-	≥32R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1S	-	OXA-23 (8), OXA-51 (8)
	4 (n=6)	8S	≥16R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1S	-	OXA-23 (5), OXA-51 (5)
	5 (n=5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8I	-	-	OXA-23 (5), OXA-51 (5)

CLASSE	Aminoglicosídeos		Penicilina	Penicilina + inibidor	Cefalosporinas II			Cefalosporinas III		Cefalosporinas IV	Fluoroquinolonas	Carbapenênicos		Glicilicinas	Polimixinas	Genes de Resistência detectados (nº de isolados)	
	Antimicrobiano	AMI	GEN	AMP	AMS	FOX	CXM	CXMa	CAZ	CRO	CPM	CIP	IMP	MER	TGC		COL
6 (n=4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4I	-	OXA-23 (4), OXA-51 (4)
7 (n=2)	≥64R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4I	-	OXA-23 (2), OXA-51 (2)
8 (n=3)	-	4S	-	8S	-	-	-	-	-	-	-	-	8I	-	4I	-	OXA-23 (3), OXA-51 (3)
9 (n=3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8I	-	4I	-	OXA-23 (3), OXA-51 (3)
10 (n=1)	≤2S	≤1S	-	4S	-	-	-	-	8R	16I	16I	≤025S	8I	-	≤0,5S	-	OXA-23 (1), OXA-51 (1)
11 (n=1)	32I	4S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OXA-23 (1), OXA-51 (1)
12 (n=1)	32I	4S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4I	-	OXA-23 (1), OXA-51 (1)

CLASSE	Aminoglicosídeos		Penicilina	Penicilina + inibidor	Cefalosporinas II			Cefalosporinas III		Cefalosporinas IV	Fluoroquinolonas	Carbapenémicos		Glicíclicas	Polimixinas	Genes de Resistência detectados (nº de isolados)
	AMI	GEN	AMP	AMS	FOX	CXM	CXMa	CAZ	CRO	CPM	CIP	IMP	MER	TGC	COL	
13 (n=1)	≥64R		-	-	-	-	-	-	-	-	-	8I	-	-	-	OXA-23 (1), OXA-51 (1)
14 (n=1)	-		-	4S	-	-	-	-	-	-	-	8I	8I	-	-	OXA-23 (1), OXA-51 (1)
15 (n=1)	-	≥16R	-	NT	NT	-	-	NT	-	-	-	NT	-	NT	NT	OXA-23 (1), OXA-51 (1)
16 (n=34)	≤2S	≤1S	-	≤2S	-	32R	32R	4S	16I	2S	≤025S	≤025S	≤025S	≤0,5S	-	OXA-23 (2), OXA-51 (11), CTXM8 (1), SHV (1)
17 (n=1)	≥64R	4S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤0,5S	4S	4I	-	OXA-51 (1)
18 (n=1)	-	≤1S	-	≥32R	-	-	-	-	-	-	-	4S	8I	4I	-	OXA-23 (1), OXA-51 (1)
19 (n=1)	≤2S	≤1S	-	≤2S	-	-	-	8R	32I	8S	-	≤025S	0.5S	1S	-	OXA-51 (1)

CLASSE	Aminoglicosídeos		Penicilina	Penicilina + inibidor	Cefalosporinas II			Cefalosporinas III		Cefalosporinas IV	Fluoroquinolonas	Carbapenênicos		Gliciliclinas	Polimixinas	Genes de Resistência detectados (nº de isolados)
	Antimicrobiano	AMI	GEN	AMP	AMS	FOX	CXM	CXMa	CAZ	CRO	CPM	CIP	IMP	MER	TGC	
20 (n=3)	≤2S	≤1S	-	≤2S	-	16I	16I	8R	16I	2S	≤02 5S	≤02 5S	1S	≤0,5 S	-	OXA-23 (2)
21 (n=1)	16S	4S	-	NT	NT	-	-	NT	-	-	-	NT	1S	NT	NT	OXA-23 (1), OXA-51 (1)
22 (n=1)	1S	≤1S	16R	NT	NT	-	-	NT	16I	8S	≤02 5S	NT	0.5S	NT	NT	
23 (n=4)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	-	NT	NT	OXA-23 (4), OXA-51 (3)
24 (n=2)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	≤02 5S	≤025 S	NT	NT	OXA-23 (2)

NT: Não testado, S: Ruscetível, R: Resistente, I: Resistência intermediária, AMI: Amicacina, GEN: Gentamicina, AMP: Ampicilina, AMS: Ampicilina/sulbactam, FOX: Cefoxitina, CXM: Cefuroxima, CXMa: Cefuroxima Acetil, CAZ: Ceftazidima, CRO: Ceftriaxona, CPM: Cefepime, CIP: Ciprofloxacino, IMP: Imipenem, MER: Meropenem, TGC: Tigeciclina, COL: Colistina. (-): Significa que o perfil é igual ao fenótipo mais prevalente. Fonte: da autora.

No Brasil, a recomendação do Ministério da Saúde, é que os testes para detecção da suscetibilidade sejam realizados segundo as recomendações do CLSI (CLSI, 2015) ou do BrCast (BRCAST, 2016), a não ser que haja disposição em contrário por meio de notas técnicas específicas. O BrCAST é um comitê que tem como objetivo rever periodicamente pontos de corte para interpretação dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos para uso clínico e com finalidade epidemiológica buscando uma harmonização com o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) e o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), adequando os pontos de corte para a realidade brasileira. O CLSI, bastante utilizado pelos laboratórios brasileiros, tem a desvantagem de ser um sistema pago e estar em língua inglesa (podendo levar a erros de interpretação), já o BrCAST, apesar de ainda se tratar de uma tradução do EUCAST, é gratuito.

Das 140 amostras, 99 (70,7%) foram classificados como MDR (resistentes a um ou mais agentes de três ou mais classes de antimicrobianos). Todos os 99 MDR foram identificados como Complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* e 96 desses (96,9%) foram resistentes aos carbapenêmicos, sendo uma das taxas mais altas vistas entre os trabalhos.

Um hospital de Porto Alegre analisou as amostras de *Acinetobacter* spp. de quatro hospitais do Rio grande do Sul, os quais apresentaram uma média de 69% dos isolados resistentes aos carbapenêmicos, sendo que a maior resistência foi de 87% (FERREIRA *et al.*, 2011). Outro estudo dos Estados Unidos analisou três períodos diferentes (2003–2005, 2006–2008, 2009–2012), onde a resistência aos carbapenêmicos passou de 21% de 2003-2005 para 47,9% em 2009-2012, e a prevalência de *A. baumannii* MDR foi de 35,2% (ZILBERBERG *et al.*, 2016). Outro trabalho dos Estados Unidos que analisou um período semelhante (1999 a 2010) encontrou uma prevalência de *A. baumannii* MDR de 32.1% em 1999 para 51.0% em 2010 (CDDEP, 2016). Em 100 isolados coletados do maior hospital de Kuwait, Vali e colaboradores encontraram 33% de MDR durante 2011 a 2012, e desses, 45% eram resistentes aos

carbapenêmicos (VALI *et al.*, 2015). Um programa de vigilância de antimicrobianos que envolveu a América Latina, mostrou taxas de resistência aos carbapenêmicos crescentes com o passar dos anos: de 6.4%, 12.6% e 0.0%, entre os anos de 1997 a 1999, para 84.9%, 71.4% e 50.0% de 2008 a 2010, na Argentina, Brasil e Chile, respectivamente (GALES *et al.*, 2012).

Todos os isolados foram 100% sensíveis à polimixina. Dos 130 testados para tigeciclina, 15 (11,5%) apresentaram resistência intermediária para esse antimicrobiano. Em comparação com outros estudos feitos no Kuwait e nos Estados Unidos as porcentagens são semelhantes, em torno de 2,8% de resistência à polimixina e 12% à tigeciclina (VALI *et al.*, 2015; ZILBERBERG *et al.*, 2016). Outro estudo ainda apresenta 100% de suscetibilidade aos dois antimicrobianos (RIVERA *et al.*, 2016).

Em casos de infecções por bactérias multirresistentes, a tigeciclina e colistina (polimixina E) são recomendadas como a última opção terapêutica, podendo ser usadas em combinação. Porém, recentemente alguns *A. baumannii* MDR tem demonstrado resistência a esses antimicrobianos, principalmente à colistina, o que antes era bastante raro (SADER *et al.*, 2013; VALI *et al.*, 2015). Em revisão atual, foi relatada considerável perda de atividade da colistina contra *A. baumannii* com o passar dos anos, de 2,8% em 2006-2008 para até 6,9% de 2009 a 2012 (ZILBERBERG *et al.*, 2016).

4.4 GENES DE RESISTÊNCIA

Foram pesquisados por qPCR genes para diferentes beta-lactamases que pudessem ajudar a explicar o genótipo de resistência dos isolados: Oxacilinases hidrolizantes de carbapenêmicos (*blaOXA-51-like*, *blaOXA-58-like*, *blaOXA-23-like*, *blaOXA-72-like*, *blaOXA-143-like*, *blaOXA-48-like*), ESBLs (*blaSHV*, *blaCTXM-1*, *blaCTXM-2*, *blaCTXM-8*, *blaCTXM-9*) e carbapenemases (*blaIMP*, *blaVIM*, *blaKPC*, *blaNDM*, *blaGES*).

O gene *blaOXA-23*, que confere resistência aos carbapenêmicos, foi o mais encontrado entre os 140 isolados:

103 (73,5%) foram positivos, e desses, 97 (97,9%) eram MDR. Dos positivos para OXA-23, 99 eram do Complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, 2 *A. radioresistens* e 2 *A. lwoffii*.

Em *Acinetobacter* spp., o gene *bla*OXA-23 é o mais prevalente em todo o mundo. O primeiro achado de *A. baumannii* MDR positivo no Brasil foi em 2003 em Curitiba/PR, onde todos os isolados em surtos em dois hospitais foram OXA-23 positivos (DALLA-COSTA *et al.*, 2003). Em seguida, em 2009, todos os isolados de sete hospitais no Rio de Janeiro apresentavam o gene, que, a partir de então, vem se disseminando por todo o Brasil (CARVALHO *et al.*, 2009).

Além da alta prevalência, sete isolados apresentaram o gene *bla*OXA-23 porém não apresentaram resistência fenotípica aos carbapenêmicos. Isso ocorreu com os 2 *A. radioresistens* e *A. lwoffii* e 3 do Complexo *A. baumannii-calcoaceticus*. Apesar de não terem ainda resistência aos carbapenêmicos, a expressão pode ocorrer a qualquer momento sob pressão seletiva, já que são portadores do gene.

Enzimas OXA-tipo hidrolisam os carbapenêmicos, mas não mostram sempre um perfil de resistência aos mesmos. Porém, quando esses genes são associados a elementos de inserção como o ISAb₁, podem ter sua expressão aumentada e conferirem resistência aos carbapenêmicos (FERREIRA *et al.*, 2011). Esse pode ser o caso dos sete isolados que possuem o gene, mas não o fenótipo. Um estudo no Brasil encontrou resultado semelhante, com oito isolados sensíveis aos carbapenêmicos, mas portadores do gene *bla*OXA-23 (CHAGAS *et al.*, 2014).

Outro gene bastante prevalente que confere resistência intrínseca em *A. baumannii* é o *bla*OXA-51, aqui encontrado em 109 (77,8%) dos isolados analisados.

Um dos únicos estudos no Brasil que analisou várias regiões do país, mostrou que dos 146 isolados resistentes aos carbapenêmicos, de 11 estados, entre 2008 a 2011, o gene *bla*OXA-51 foi encontrado em todos os isolados e 94,2% foram positivos para OXA-23, bastante semelhante com nossos dados. Chagas e colaboradores encontraram 97,9% dos *Acinetobacter*

spp. resistentes aos carbapenêmicos que foram positivos para OXA-23 e 100% para OXA-51(CHAGAS *et al.*, 2014). Outros estudos também mostraram dados semelhantes. O de Prates e colaboradores encontrou 100% dos isolados portando os genes *bla*OXA-23 e *bla*OXA-51(PRATES *et al.*, 2011), e outro onde 85% apresentaram OXA-23 positivo (VALI *et al.*, 2015).

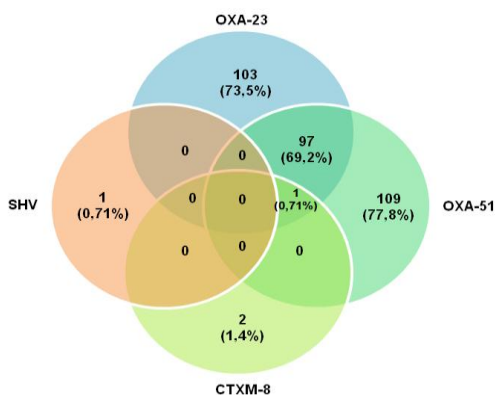
Genes para ESBL (Beta-lactamases de espectro estendido) foram encontrados em 3 amostras (2,1%): duas amostras positivas para o gene *bla*CTXM-8 (1,4%) e uma para *bla*SHV (0,71%). Esses genes conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e não são muito pesquisados aqui no Brasil. (Tabela 2). Alguns estudos europeus apresentam taxas de ESBL mais altas que as encontradas em nosso trabalho: podendo variar de 0-85% para SHV, uma variação de 20 a 72% para CTXM-8, 20-71% para TEM e 30% VIM (ALYAMANI *et al.*, 2015; SAFARI *et al.*, 2015; SINHA *et al.*, 2007). Um estudo do Chile também relatou baixas taxas de ESBL (10,1%) e chegaram à conclusão que o mecanismo principal para a resistência às cefalosporinas, seria pela produção de AmpC cromossomicamente codificada ao invés de ESBL em *A. baumannii*. Podendo ser o mesmo caso de nossas amostras que apresentaram taxas baixas de genes para ESBL (KEMPF; ROLAIN, 2012; PINO *et al.*, 2007).

No presente trabalho não foram detectados os genes *bla*IMP, *bla*VIM, *bla*KPC, *bla*NDM e *bla*GES. Na figura 6, pode-se visualizar o número de amostras que foram encontrados os genes de resistência. Na tabela 2 também pode ser visto os genes de resistência encontrados em cada perfil fenotípico do TSA.

Outros mecanismos de resistência bastante importantes em *Acinetobacter* spp., são a perda ou redução da expressão de porinas e a superexpressão de bombas de efluxo (não avaliados neste trabalho), que estão relacionados com a diminuição da suscetibilidade aos antimicrobianos e à biocidas, que são anti-sépticos e desinfetantes comumente utilizados nos hospitais como a clorexidina (FERNANDEZ-CUENCA *et al.*, 2015). Esse tipo de resistência também explica o fato desse microrganismo

possuir várias resistências intrínsecas a antimicrobianos (VILA *et al.*, 2007). Lin e colaboradores mostraram que a maioria das bombas de efluxo são encontradas em *Acinetobacter* spp. MDR, e o que muda entre elas é a sua expressão, sendo algumas mais responsáveis pelas resistências do que outras. A resistência à tigeciclina tem sido bastante relacionada com a superexpressão de bombas de efluxo (LIN *et al.*, 2015; POURNARAS *et al.*, 2015). Portanto, um estudo desses tipos de mecanismos se faz necessário para uma compreensão ainda maior das bactérias circulantes MDR.

Figura 6: Prevalência dos genes de resistência encontrados neste estudo. A figura mostra a intersecção de valores, pois algumas amostras apresentaram mais de um gene.



Fonte: da autora.

4.5 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES

A fim de validar uma técnica fenotípica rápida e barata para a detecção de carbapenemases no HU-UFSC, alguns isolados dentre os 140 foram escolhidos para avaliação pelo teste Blue-Carba. Dentro dos 24 perfis distintos obtidos pelo TSA (Tabela 2), foram escolhidas duas amostras de cada perfil e, para aqueles perfis que eram compostos apenas de um único

isolado, o mesmo foi utilizado para o teste. Além do perfil de TSA, também se levou em consideração os genes de resistência para que se tivesse pelo menos um exemplar de cada perfil de TSA/genes de resistência para o teste Blue-Carba. No total foram testados 40 isolados. Desses, os que o resultado da coloração não ficou muito evidente para leitura (n=6), foram repetidos com maior quantidade de bactéria para confirmação do resultado.

No caso do *Acinetobacter* spp., a capacidade hidrolítica das oxa-carbapenemases (CHDLs) é menor do que no caso das Metalo- β -lactamases, encontradas por exemplo nas enterobactérias e mais raras em *Acinetobacter* spp., por isso, a recomendação é que se utilize uma maior quantidade de bactéria para o teste. Isso pode ser evidenciado nas amostras que foram repetidas: apesar de no primeiro teste as amostras já serem positivas, com a repetição aumentando a quantidade de bactéria, esse resultado positivo foi evidenciado mostrando uma coloração verde mais forte e facilitando a leitura do resultado (ABBOTT *et al.*, 2013; PIRES *et al.*, 2013).

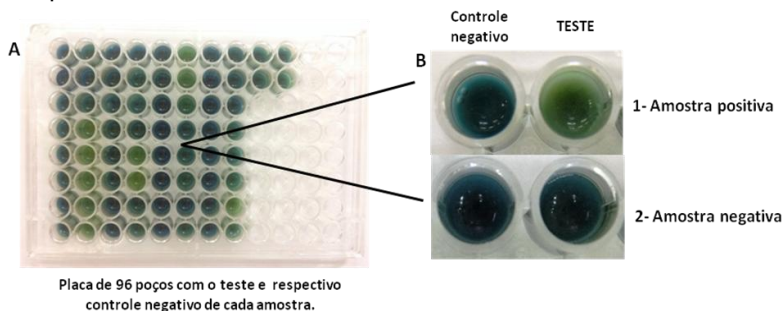
A quantidade de bactéria utilizada para fazer o inóculo, independente se for uma grande quantidade, como recomendado no *Acinetobacter* spp., ou não, deve ser sempre a mesma no poço teste e no poço controle, para evitar falsos negativos ou positivos, esse detalhe é muito importante e crucial para o teste. A homogeneização correta da bactéria na solução e a correta estocagem dos reagentes, principalmente do imipenem, também são citados como detalhes importantes para o sucesso dessa técnica (PIRES *et al.*, 2013; PIRES *et al.*, 2016).

Um teste positivo é caracterizado pelo meio mais ácido do teste em relação ao controle negativo indicado pelo indicador de pH: amarelo versus azul, amarelo versus verde e verde versus azul. Para as amostras testadas o controle negativo ficou com a coloração azul e quando a amostra foi positiva para carbapenemases o teste se tornou verde.

Na figura 7, pode-se ver a placa onde foi realizado o teste de Blue-Carba e exemplo de amostra positiva e negativa que foram testadas.

Alguns trabalhos também encontraram resultados satisfatórios com esse teste, com 100% de sensibilidade para as amostras testadas. Um estudo fez uma comparação dos testes Blue-Carba e do Carba-NP, onde 3 pessoas diferentes fizeram a leitura das amostras, mostrando 100% de sensibilidade, o Blue-Carba se mostrou um pouco menos específico; porém, os detalhes importantes da técnica citados anteriormente, como quantidade do inóculo, homogeneização e estocagem foram citados como uma possível falha no momento do teste desse trabalho. Também foi comentado que um aumento na quantidade de bactéria seria importante não somente para *Acinetobacter* spp., mas para todas as bactérias, a fim de facilitar a visualização da coloração (PIRES *et al.*, 2016). Outro trabalho testou o Blue-Carba em amostras de pacientes e do ambiente com diferentes tipos de carbapenemases, e igualmente encontrou alta sensibilidade (98-100%) e especificidade (100%) (GARCIA-FERNANDEZ *et al.*, 2016).

Figura 7: Teste Blue-Carba para detecção fenotípica de carbapenemases.



A) Placa de 96 poços onde foi feito o teste de Blue-Carba. B) 1- Amostra positiva para produção de carbapenemases, onde o teste passou da coloração azul para verde; 2- Amostra negativa para produção de carbapenemases, onde os dois poços, controle negativo e teste, permaneceram da mesma cor, azul.

Fonte: da autora.

Das 40 amostras testadas, todas as resistentes aos carbapenêmicos tiveram resultado positivo para o teste Blue-Carba (100% de sensibilidade), e as sensíveis aos carbapenêmicos apresentaram o resultado negativo (100% especificidade) mostrando-se um teste bastante confiável para detecção de carbapenemases entre *Acinetobacter* spp. No quadro 4, pode-se visualizar as 40 amostras testadas, qual o perfil fenotípico a que pertencem, seus genes de resistência e o resultado do teste Blue-Carba.

Quadro 4: Perfil fenotípico das 40 amostras testadas com os genes de resistência respectivos, relacionando com a resistência aos carbapenêmicos de cada isolado e o resultado do teste Blue-Carba.

Perfil fenotípico de TSA (n)	Genes de resistência	Resistente aos Carbapenêmicos	Resultado do Blue-Carba
1 (2)	Amostra 1: CTXM8, OXA-23-51	Sim	Positivo
	Amostra 2: OXA-23-51	Sim	Positivo
2 (2)	Amostra 1: OXA-51	Sim	Positivo
	Amostra 2: OXA-23-51	Sim	Positivo
3 (2)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
	Amostra 2: OXA-23-51	Sim	Positivo
4 (2)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
	Amostra 2: OXA-23-51	Sim	Positivo
5 (2)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
	Amostra 2: OXA-23-51	Sim	Positivo
6 (2)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
	Amostra 2: OXA-23-51	Sim	Positivo
7 (2)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
	Amostra 2: OXA-23-51	Sim	Positivo
8 (2)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
	Amostra 2: OXA-23-51	Sim	Positivo
9 (2)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
	Amostra 2: OXA-23-51	Sim	Positivo
10 (1)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
11 (1)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
12 (1)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
13 (1)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo

Perfil fenotípico de TSA (n)	Genes de resistência	Resistente aos Carbapenêmicos	Resultado do Blue-Carba
14 (1)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
15 (1)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
16 (4)	Amostra 1: CTXM8	Não	Negativo
	Amostra 2: SHV	Não	Negativo
	Amostra 3: OXA-23-51	Não	Negativo
	Amostra 4: OXA-23	Não	Negativo
17 (1)	Amostra 1: OXA-51	Não	Negativo
18 (1)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
19 (2)	Amostra 1: sem genes	Não	Negativo
	Amostra 2: OXA-51	Não	Negativo
20 (2)	Amostra 1: OXA-23	Não	Negativo
	Amostra 2: OXA-23	Não	Negativo
21 (1)	Amostra 1: OXA-23-51	Não	Negativo
22 (1)	Amostra 1: sem genes	Não	Negativo
23 (2)	Amostra 1: OXA-23-51	Sim	Positivo
	Amostra 2: OXA-23-51	Sim	Positivo
24 (2)	Amostra 1: OXA-23	Não	Negativo
	Amostra 2: OXA-23	Não	Negativo

Fonte: da autora.

Pasteran e colaboradores (2015) mostraram excelentes resultados onde todas as bactérias sabidamente positivas para carbapenemases das classes A, B e D de Ambler foram detectadas pelo Blue-Carba. Citam ser um teste acurado, custo-efetivo e rápido (PASTERAN *et al.*, 2015).

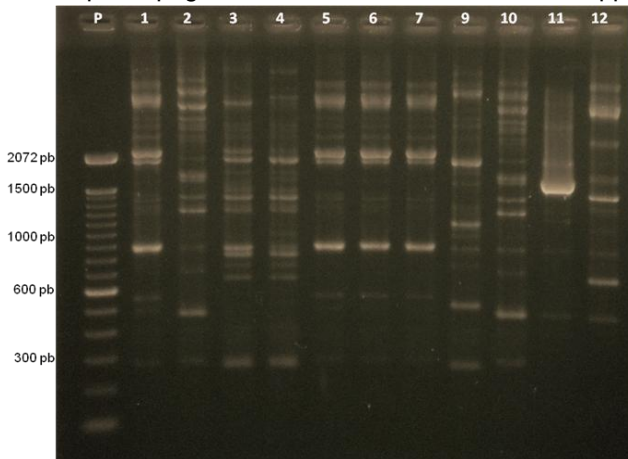
4.6 VARIABILIDADE GENÉTICA

A tipagem molecular de *Acinetobacter* spp. de pacientes e dos ambientes hospitalares é de grande valia para se estabelecer a magnitude de um surto, o quanto essas bactérias estão circulando no meio hospitalar, para o conhecimento de quantos perfis genéticos diferentes estão circulando e se esses

são epidemiologicamente relacionados ou não (DIJKSHOORN *et al.*, 2007).

Inicialmente o objetivo deste estudo era padronizar a análise por PFGE para esses isolados. Entretanto, por diversas razões, os experimentos falharam e optou-se por utilizar uma técnica mais simples (Rep-PCR), mas ainda com boa resolução, para análise da variabilidade genética dos isolados. Na figura 8, pode-se visualizar uma figura representativa dos resultados obtidos.

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1,5% representativo da Rep-PCR realizada para tipagem dos isolados de *Acinetobacter* spp.



Corrida realizada durante 3 horas e 40 minutos a 80v em tampão TBE. Do 1 ao 12 estão representados os perfis de algumas amostras testadas. Em uma análise preliminar as amostras 2 e 10, 3 e 4, e 5, 6 e 7 apresentam perfis similares entre si. P= Padrão de tamanho molecular de 100 kb (Invitrogen).

Fonte: da autora.

Após a padronização, para 13 das 140 amostras não foi possível obter um perfil de bandas por Rep-PCR, porém das 13, 12 eram sensíveis aos carbapenêmicos (Perfis fenotípicos 16, 20 e 22) e uma era resistente (Perfil fenotípico 1). Para as demais

amostras foram encontradas em torno de 15 bandas em cada isolado, um número bastante significativo para as comparações.

A técnica de Rep-PCR é bastante confiável para a comparação de isolados provenientes de um surto ou não. Resultados idênticos foram obtidos com Rep-PCR em comparação com PFGE (Padrão ouro), confirmando a excelente performance dessa técnica (BOU *et al.*, 2000). Liu e colaboradores usaram diferentes técnicas de PCR para tipagem, entre elas o Rep-PCR e o PFGE, e encontraram excelentes resultados na comparação entre os métodos, onde para o Rep-PCR foram encontrados 34 perfis diferentes de bandas e para o PFGE 37, sendo que para amostras isoladas de um surto a diferença foi de um padrão a mais para o PFGE. (LIU; WU, 1997). Para Saeed e colaboradores, entre os isolados de *A. baumannii*, o poder de discriminação entre as amostras analisadas foi comparável com os dados obtidos usando o PFGE (SAEED *et al.*, 2006).

Para Rep-PCR foram necessárias em torno de 10 horas para obtenção do gel, enquanto que para o PFGE são necessários aproximadamente 6 dias corridos (dependendo do protocolo utilizado), além do método também ser mais caro. Neste estudo a Rep-PCR se mostrou bastante vantajosa para avaliação rápida e preliminar de surtos em hospitais.

Das 127 amostras amplificadas com sucesso, foram encontrados 23 perfis diferentes de bandas, um número bastante elevado em comparação com outros estudos, como o feito por Bou e colaboradores, onde foi analisado um período de nove meses com amostras antes durante e depois de um surto e foram encontrados sete perfis genotípicos diferentes, sendo que durante o surto somente um perfil foi prevalente (BOU *et al.*, 2000). Variações entre o número de perfis podem ocorrer entre isolados coletados por períodos de tempo maior que seis meses, ou obtidos de um grande número de pacientes envolvidos em um surto de longa duração, podendo ocorrer mais de um evento genético diferente (TÉNOVER *et al.*, 1995) Em nosso estudo, a coleta foi durante oito meses, e de vários pacientes e locais diferentes, o que pode ter influenciado na variabilidade dos

perfis. Em outro estudo com menor tempo de coleta (três meses) sete perfis distintos foram encontrados (YE *et al.*, 2015).

A figura 9 apresenta um dendograma dos 23 perfis distintos encontrados, o qual mostra uma similaridade global de 70%. A interpretação da relação entre os perfis foi realizada segundo os critérios de Tenover (1995) conforme descrito no item 3.5.2.

Dentre os 23 perfis, sete foram considerados “possivelmente relacionados” com o mais prevalente, tendo entre 4-6 bandas diferentes (o que corresponde a até 2 eventos genéticos de diferenciação); e 15 perfis foram classificados como “não relacionados” com o perfil mais prevalente, tendo 7 ou mais bandas diferentes.

Todos os isolados resistentes aos carbapenêmicos foram majoritariamente classificados no perfil prevalente, além de outros dois “possivelmente relacionados” e um “não relacionado” ao perfil principal. Nesses isolados, o que chamou bastante a atenção foi que, durante os oito meses, 92,8% dos isolados resistentes aos carbapenêmicos (n=97) foram classificados em somente dois perfis mais prevalentes, compreendendo 58 (45,6%) e 32 (25,2%) isolados. Os outros sete isolados resistentes aos carbapenêmicos apresentaram mais dois perfis (Tabela 3). Os demais 19 perfis distintos foram formados por isolados sensíveis aos carbapenêmicos e por um menor número de isolados em cada um deles.

Tabela 3: Perfis gerados através do Rep-PCR dos 97 isolados resistentes aos carbapenêmicos e locais onde foram isolados.

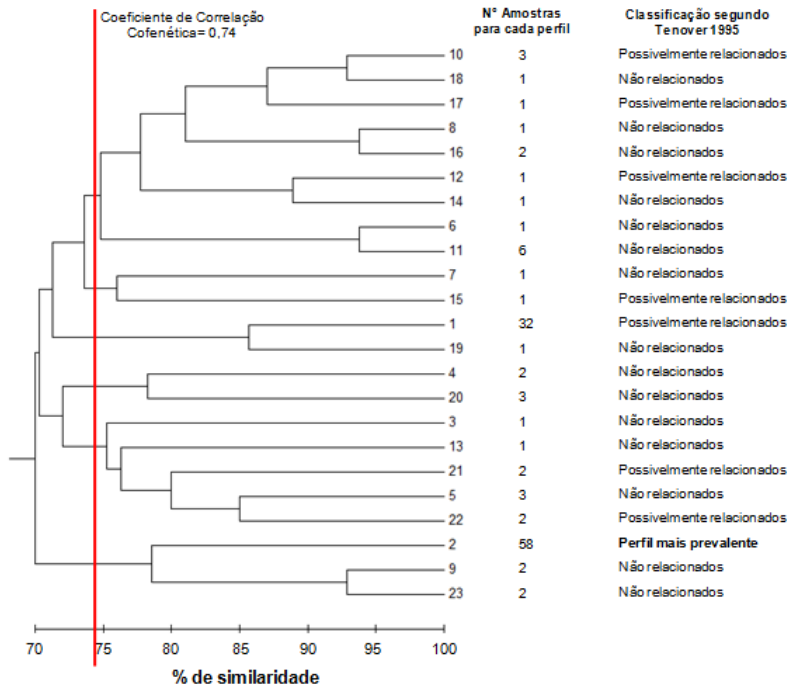
Perfil dos 97 isolados resistentes aos carbapenêmicos	Número de isolados de cada perfil	Locais onde foram encontrados
Perfil 1	32	Pacientes, grades de leitos, passante, e computadores
Perfil 2	58	Pacientes, grades de leitos, carrinho de roupa limpa, parede de gases/suporte de soro, grades, suporte de utensílios, termômetro e raioX
Perfil 11	6	Pacientes, profissional da saúde (mãos) e suporte de utensílios
Perfil 15	1	Paciente

Fonte: da autora.

Durante o surto de *Acinetobacter* spp. no HU-UFSC (junho a setembro/2015) foram encontrados dois tipos de perfis, o primeiro e o segundo mais prevalentes. Segundo o critério de Tenover (1995), esses dois perfis possuem entre 4-6 bandas diferentes, e são classificados como “possivelmente relacionados”. Geralmente um surto é causado por isolados “intimamente relacionadas”, o que parece não ser o caso.

Como já comentado, *A. baumannii* tem um elevado grau de plasticidade genômica e pode alterar rapidamente seu genoma para escapar dos mecanismos naturais de defesa do hospedeiro e da intervenção dos antimicrobianos. A recombinação do genoma promove a diversificação dos isolados nas epidemias, resultando em surtos policlonais como pode ser visto em nossos resultados (KUO *et al.*, 2014; RUMBO *et al.*, 2013).

Figura 9: Dendograma obtido após Rep-PCR de 127 isolados de *Acinetobacter* spp., mostrando 23 perfis encontrados.



As relações evolutivas foram inferidas pelo método de UPGMA. O dendograma foi desenhado em escala, com o comprimento dos ramos nas mesmas unidades que as distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. (TAMURA *et al.*, 2013). A similaridade global entre os isolados foi de 70% e o Coeficiente de Correlação Cofenética = 0,74, representado pela linha vermelha. Também está indicado o número de isolados pertencentes a cada perfil e a interpretação segundo os critérios de Tenover (1995).

Fonte: da autora.

Os dois perfis que apareceram durante o surto (Perfil 1 e 2) já haviam aparecido desde o começo da coleta, mostrando que essas bactérias estão circulando dentro do hospital e a qualquer momento podem provocar um surto como o que aconteceu durante nossa coleta.

Os lugares onde foram encontrados os isolados pertencentes aos quatro perfis de amostras resistentes aos carbapenêmicos foram bastante diversos e preocupantes, visto que essa bactéria está circulando pelo hospital com bastante facilidade. Os locais encontrados, além de pacientes, foram grades de leitos, suporte de utensílios dos leitos, passante, carrinho de roupa limpa, parede de gases e suporte de soro, computadores do local de prescrição médica, termômetro e raioX.

4.7 FEEDBACK DOS RESULTADOS PARA O HOSPITAL

Nas reuniões que foram realizadas para algumas equipes do HU-UFSC, os resultados de cada ala foram apresentados e os pontos críticos foram enfatizados para que se pudessem tomar algumas atitudes, visto que os resultados foram bastante alarmantes. No apêndice B pode-se ver imagens de como os resultados são visualizados no software Epiome.

Já se tem o conhecimento que a contaminação do ambiente pode ser um reservatório de microrganismos que podem ser transferidos para os pacientes. Para o combate de surtos em larga escala, várias medidas devem ser tomadas, como melhorar a higiene das mãos, limpeza e desinfecção do ambiente regularmente, treinamento dos funcionários, isolamento de pacientes, maior restrição ao acesso da UTI e até mesmo fechar uma ala ou ambiente para limpeza e desinfecção (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; VAN DEN BROEK *et al.*, 2006).

Neste estudo, em um leito da UTI, a eficácia da limpeza foi testada utilizando o sequenciamento do gene 16s rDNA. *Swabs* foram coletados após uma limpeza terminal do leito, que é feita sempre que o mesmo é desocupado por um paciente, onde tudo que se encontra no quarto é limpo e desinfetado. Essa limpeza

mostrou grande eficácia, pois o número de sequências de bactérias encontradas pelo sequenciamento foi baixíssimo comparando com o quarto sujo. Porém, essa limpeza deveria ser feita com mais frequência, pois os resultados dos quartos dos pacientes que coletamos quando estão ocupados mostram alta contaminação.

Em uma sala de lanche o mesmo procedimento foi feito, porém os resultados foram bastante preocupantes. O número de sequências bacterianas não diminuiu nem pela metade comparando com a sala suja. A sala de lanche é um ambiente comum a todos os funcionários da ala e a limpeza das superfícies de alto contato, como os eletrodomésticos e armários, raramente é feita. Com isso suspeita-se de formação de biofilme nesses locais, onde uma única limpeza e desinfecção não são capazes de diminuir significativamente o número de bactérias.

Considerando a situação do hospital, várias recomendações foram sugeridas para a equipe de cada ala e para a CCIH. Com o passar de todas as coletas nossa equipe pode perceber várias condutas, que se evitadas, poderiam reverter à taxa de infecção hospitalar, não somente causada pelo *Acinetobacter* spp., mas também por todos os microrganismos. Elas foram indicadas conforme os resultados obtidos levando em consideração os pontos críticos de cada ala.

Para UTI:

-Melhoria do processo de rastreamento de pacientes colonizados por bactérias multirresistentes – rastreamento global, diversificar sítios;

-Melhoria do processo de identificação e sinalização de pacientes colonizados por bactérias multirresistentes;

-Intensificação dos procedimentos de limpeza e desinfecção concorrente e terminal dos leitos;

-Avaliação da conduta de acompanhantes – realizar campanhas de conscientização, reunião prévia à visita e vistoria de lavagem de mãos antes da visita;

- Reavaliação dos procedimentos de limpeza da Sala de Lanche – implementar limpeza terminal padrão;
- Adequação do uso da sala de lanche e áreas de estar;
- Reavaliação do procedimento de uso e limpeza dos equipamentos de uso comum como o carrinho de banho, poltrona de fisioterapia, carrinho de roupa limpa, raioX, geladeiras, passantes, dispensadores entre outros (frequência de utilização e limpeza);
- Avaliação da substituição do suporte de utensílios dos leitos;
- Campanha para conscientização da equipe em relação ao uso das áreas comuns de trabalho;
- Campanha para conscientização da equipe de profissionais da saúde quanto à lavagem de mãos e utilização de equipamentos de proteção individual;
- Conscientização para limpeza do celular.

Para a EMG:

- Melhoria do processo de rastreamento de pacientes colonizados por bactérias multirresistentes;
- Intensificação dos procedimentos de limpeza e desinfecção concorrente e terminal dos leitos;
- Aumento da frequência de limpeza dos banheiros de uso comum dos pacientes;
- Avaliação dos procedimentos de limpeza do carro de medicação e poltronas da sala de medicação;
- Avaliação dos procedimentos de limpeza dos consultórios médicos;
- Campanha para conscientização da equipe em relação ao uso das áreas comuns de trabalho;
- Campanha para conscientização da equipe de profissionais da saúde quanto à lavagem de mãos e utilização de equipamentos de proteção individual;
- Conscientização para limpeza do celular;
- Adequação do uso da sala de lanche e áreas de estar.

Para a CRI:

-Interdição da Sala de Lanche para uma série de limpezas terminais – eliminação de biofilme. Conduta a ser adotada também para Repouso médico e da enfermagem;

-Reavaliação dos procedimentos de limpeza da sala de lanche, repouso médico e da enfermagem – implementar limpeza terminal padrão. Limpeza dos eletrodomésticos e bancadas com produto de escolha ou álcool 70% pelos usuários;

-Adequação do uso da sala de lanche, repouso médico e da enfermagem. Vestimenta, lavagem de mãos.

Para a CMI:

-Campanha para conscientização da equipe em relação ao uso das áreas comuns de trabalho, como posto de enfermagem e sala de curativos;

-Campanha para conscientização da equipe de profissionais da saúde quanto à lavagem de mãos e utilização de equipamentos de proteção individual, principalmente por ser uma ala inteira para pacientes em isolamento;

-Conscientização para limpeza do celular com produto de escolha do hospital ou álcool gel;

-Avaliação da vestimenta da unidade;

-Melhoria do processo de identificação e sinalização de pacientes colonizados por bactérias multirresistentes – pacientes colonizados sem identificação;

-Intensificação dos procedimentos de limpeza e desinfecção concorrente e terminal dos leitos (em especial a concorrente);

-Avaliação da conduta de acompanhantes – realizar campanhas de conscientização.

5 CONCLUSÕES

✓ Durante 8 meses foram coletadas 1.430 amostras provenientes de 5 alas do HU-UFSC. Dessas, 575 bactérias foram isoladas, sendo 140 *Acinetobacter* spp.;

✓ A UTI foi o local com maior número de amostras positivas (65%) para *Acinetobacter* spp.;

✓ Dos locais mais contaminados se destacam as salas de lanches e equipamentos de uso comum, ambos com 27,6% dos isolados ambientais de *Acinetobacter* spp. Entre os profissionais, as mãos foram o sítio mais contaminado (57,1%) e entre os 336 pacientes analisados, 27,3% estavam infectados/colonizados com *Acinetobacter* spp.;

✓ Dos 140 isolados, 70,7% são MDR e 96,9% desses são resistentes aos carbapenêmicos. Todos os isolados foram 100% sensíveis à polimixina e 11,5 % apresentaram resistência intermediária à tigeciclida;

✓ O gene *bla*OXA-23 foi encontrado em 73,5% dos isolados e desses, 97,9% eram MDR. O segundo gene mais prevalente foi o *bla*OXA-51, encontrado em 77,8% das amostras. Genes para ESBL foram encontrados em 2,1% dos isolados. Não foram encontrados genes de carbapenemases das classes A e B;

✓ O teste Blue-Carba apresentou 100% de sensibilidade e especificidade entre as amostras analisadas e representa uma alternativa rápida e barata para detecção fenotípica de carbapenemases em ambiente hospitalar;

✓ Das 127 amostras que foram tipadas por Rep-PCR, 23 perfis de bandas foram encontrados, sendo quatro desses de isolados resistentes aos carbapenêmicos;

✓ De junho a setembro/2015 ocorreu um surto causado por isolados de *Acinetobacter* spp. “possivelmente relacionados”;

✓ Apesar das sugestões fornecidas ao HU-UFSC, não se observou redução significativa da contaminação ambiental, revelando falhas nos procedimentos padrões para prevenção de disseminação bacteriana.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em todo o mundo o *Acinetobacter* spp. é considerado bastante problemático devido sua capacidade de causar infecções nosocomiais, principalmente pelas altas taxas de resistência aos carbapenêmicos. A erradicação desse microrganismo demanda de bastante esforço e uma combinação de estratégias rígidas que devem ser tomadas por todos os envolvidos dentro do hospital. As medidas para o combate de surtos em larga escala, na ausência de uma fonte comum, vão desde medidas simples como a lavagem das mãos, limpeza e desinfecção do ambiente, e cursos de capacitações dos funcionários até medidas mais drásticas como a fechamento de um ala ou ambiente para tentar a eliminação completa da contaminação, já que a formação de biofilme por esse microrganismo é bastante frequente.

Os resultados encontrados neste trabalho evidenciam alguns pontos críticos no hospital e mostram que uma detecção rápida dos genes de resistência circulantes e dos perfis genéticos existentes pode contribuir objetivamente nas condutas para a redução das taxas de IRAS. Também foram validadas metodologias mais rápidas e baratas para detecção fenotípica de carbapenemases (Blue-Carba) e para o estudo da epidemiologia molecular de bactérias circulantes no hospital (Rep-PCR).

O maior desafio de todos os países é fazer com que os hospitais sejam mais seguros para os pacientes críticos ou não. Para isso, uma conscientização de todo o hospital, não somente dos profissionais que entram em contado direto com os pacientes, deve ser feita e as medidas estabelecidas devem ser seguidas seriamente, não somente durante um surto, mas durante todos os dias como medidas de prevenção.

7 PERSPECTIVAS

✓ Estudar o mecanismo de resistência de porinas e genes relacionados com expressão de bombas de efluxo em *Acinetobacter* spp.;

✓ Detectar o ambiente genético dos genes de resistência encontrados;

✓ Caracterizar os elementos de inserção dos isolados (ISAbas);

✓ Amplificar e sequenciar os genes de resistência;

✓ Avaliar a clonalidade dos isolados de *A. baumannii* baseado no sequenciamento do 16S rDNA.

REFERÊNCIAS

ABBO, A., et al. Impact of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* on clinical outcomes. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.26, n.11, p.793-800. 2007.

ABBOTT, I., et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.11, n.4, p.395-409. 2013.

AJAO, A. O., et al. Comparison of culture media for detection of *Acinetobacter baumannii* in surveillance cultures of critically-ill patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.30, n.11, p.1425-1430. 2011.

ALBERTI, C., et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Med**, v.28, n.2, p.108-121. 2002.

ALLEGIANZI, B., et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v.377, n.9761, p.228-241. 2011.

ALYAMANI, E. J., et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) produced by clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v.14, p.38. 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diagnóstico do controle de infecção hospitalar no Brasil. Brasília (DF)**. 2005

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medidas de Prevenção e Controle de Infecções Por Enterobactérias Multirresistentes, Nota Técnica nº1**. Brasília, DF 17 jan. 2013a

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (2013 – 2015)**. 2013b

AYBEY, A. D., et al. Evaluation of an automated system for the detection of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* and assessment of metallo-beta-lactamase production using two different phenotyping methods. **J Microbiol Methods**, v.86, n.1, p.121-123. 2011.

BHARDWAJ, A. K.MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v.7, n.1, p.73-89. 2012.

BIOMÉRIEUX. **VITEK 2™ - Technology. Online Software User Manual** 2006.

BONNIN, R. A., et al. Phenotypic, Biochemical, and Molecular Techniques for Detection of Metallo-beta-Lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.4, p.1419-1421. 2012.

BOSSHARD, P. P., et al. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. **J Clin Microbiol**, v.44, n.4, p.1359-1366. 2006.

BOU, G., et al. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect**, v.6, n.12, p.635-643. 2000.

BRASIL. **Lei no. 9.431, de 06 de Janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade de manutenção de programas de**

controle de infecção hospitalar pelos hospitais do país.
Brasília: Diário Oficial da União. 1997

BRCAST. BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos.** 2016

CARVALHO, K. R., et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v.34, n.1, p.25-28. 2009.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Antibiotic resistance threats in the United States**, 2013. 2013

CDDEP, THE CENTER FOR DISEASE DYNAMICS. **Economics and Policy. Resistance map: *Acinetobacter baumannii* overview. Disponível em 9 de março de 2016 em [:http://www.cddep.org/projects/resistance_map/acinetobacter_baumannii](http://www.cddep.org/projects/resistance_map/acinetobacter_baumannii)** 2016.

CHAGAS, T. P., et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.79, n.4, p.468-472. 2014.

CHOPRA, I., et al. Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement. **Lancet Infect Dis**, v.8, n.2, p.133-139. 2008.

CHUANG, Y. C., et al. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with acinetobacter bacteremia. **Clin Infect Dis**, v.52, n.3, p.352-360. 2011.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, M100-S25**. 2015

COYNE, S., et al. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.3, p.947-953. 2011.

COYNE, S., et al. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.10, p.4389-4393. 2010.

CUZON, G., et al. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). **J Antimicrob Chemother**, v.67, n.8, p.1865-1869. 2012.

D'AMORE, R., et al. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. **BMC Genomics**, v.17, n.1, p.55. 2016.

DALLA-COSTA, L. M., et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **J Clin Microbiol**, v.41, n.7, p.3403-3406. 2003.

DAMIER-PIOLLE, L., et al. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.2, p.557-562. 2008.

DIJKSHOORN, L., et al. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.12, p.939-951. 2007.

DORTET, L., et al. Strategy for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v.58, n.4, p.2441-2445. 2014.

DORTET, L., et al. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. by using a biochemical test. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, n.12, p.6437-6440. 2012.

DURMAZ, R., et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of Acinetobacter baumannii, Escherichia coli and Klebsiella spp. **Jpn J Infect Dis**, v.62, n.5, p.372-377. 2009.

ENDO, S., et al. Molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible Acinetobacter baumannii in Japan. **J Antimicrob Chemother**, v.67, n.7, p.1623-1626. 2012.

FERNANDEZ-CUENCA, F., et al. Reduced susceptibility to biocides in Acinetobacter baumannii: association with resistance to antimicrobials, epidemiological behaviour, biological cost and effect on the expression of genes encoding porins and efflux pumps. **J Antimicrob Chemother**, v.70, n.12, p.3222-3229. 2015.

FERREIRA, A. E., et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of Acinetobacter sp from hospitals in Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v.44, n.6, p.725-730. 2011.

FONTANA, C., et al. Use of the MicroSeq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.615-619. 2005.

FOXMAN, B., et al. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiol Perspect Innov**, v.2, p.10. 2005.

GALES, A. C., et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.73, n.4, p.354-360. 2012.

GARCIA-FERNANDEZ, S., et al. Detection of Carbapenemase Production in a Collection of Enterobacteriaceae with Characterized Resistance Mechanisms from Clinical and Environmental Origins by Use of Both Carba NP and Blue-Carba Tests. **J Clin Microbiol**, v.54, n.2, p.464-466. 2016.

GARCIA-VALLVÉ, SANTIPUIGBO, PERE. **DendroUPGMA: A dendrogram construction utility. Disponível em: <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>** 2016.

GIRLICH, D., et al. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol**, v.50, n.2, p.477-479. 2012.

GLEW, R. H., et al. Infections with *Acinetobacter calcoaceticus* (*Herellea vaginicola*): clinical and laboratory studies. **Medicine (Baltimore)**, v.56, n.2, p.79-97. 1977.

GRIBUN, A., et al. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. **Curr Microbiol**, v.47, n.5, p.434-443. 2003.

HERITIER, C., et al. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAb₁ in *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n.2, p.123-130. 2006.

HIGGINS, P. G., et al. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bloodstream isolates obtained in the United States from 1995 to 2004 using rep-PCR and multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol**, v.50, n.11, p.3493-3500. 2012.

JANDA, J. M.ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **J Clin Microbiol**, v.45, n.9, p.2761-2764. 2007.

JORGENSEN, J. H.FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clin Infect Dis**, v.49, n.11, p.1749-1755. 2009.

KEMPF, M.ROLAIN, J. M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. **Int J Antimicrob Agents**, v.39, n.2, p.105-114. 2012.

KIM, U. J., et al. Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. **Chonnam Med J**, v.50, n.2, p.37-44. 2014.

KLEVENS, R. M., et al. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. **Public Health Rep**, v.122, n.2, p.160-166. 2007.

KULAH, C., et al. Detecting imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* by automated systems (BD Phoenix, Microscan WalkAway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway. **BMC Infect Dis**, v.9, p.30. 2009.

KUO, H. Y., et al. Insertion Sequence Transposition Determines Imipenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Microb Drug Resist**. 2014.

KUO, H. Y., et al. Distribution of blaOXA-carrying imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in 3 hospitals in Taiwan. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.66, n.2, p.195-199. 2010.

LAU, S. K., et al. Usefulness of the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system for identification of anaerobic Gram positive bacilli isolated from blood cultures. **J Clin Pathol**, v.59, n.2, p.219-222. 2006.

LEE, H. W., et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clin Microbiol Infect**, v.14, n.1, p.49-54. 2008.

LIN, M. F., et al. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. **J Microbiol Immunol Infect**. 2015.

LIU, P. Y. F. WU, W. L. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus* *Acinetobacter baumannii* complex. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.29, n.1, p.19-28. 1997.

MACCANNELL, D. Bacterial strain typing. **Clin Lab Med**, v.33, n.3, p.629-650. 2013.

MACVANE, S. H. Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit: A Focus on Gram-Negative Bacterial Infections. **J Intensive Care Med**. 2016.

MAGILL, S. S., et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **N Engl J Med**, v.370, n.13, p.1198-1208. 2014.

MAGIORAKOS, A. P., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, v.18, n.3, p.268-281. 2012.

MARCHAND, I., et al. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.9, p.3298-3304. 2004.

MARKELZ, A. E., et al. Carbapenem Susceptibility Testing Errors Using Three Automated Systems, Disk Diffusion, Etest, and Broth Microdilution and Carbapenem Resistance Genes in Isolates of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.10, p.4707-4711. 2011.

MARQUE, S., et al. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. **J Clin Microbiol**, v.43, n.9, p.4885-4888. 2005.

MARTINS, A. F., et al. Spectroscopic, radiochemical, and theoretical studies of the Ga³⁺-N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES buffer) system: evidence for the formation of Ga³⁺ - HEPES complexes in (68) Ga labeling reactions. **Contrast Media Mol Imaging**, v.8, n.3, p.265-273. 2013.

MARTINS, A.F., BARTH, A.L. Multidrug-resistant *Acinetobacter* – a challenge for public health. **Scientia Medica**, v.23, p.56-62. 2013.

MENDES, R. E., et al. Comprehensive assessment of tigecycline activity tested against a worldwide collection of *Acinetobacter* spp. (2005-2009). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.68, n.3, p.307-311. 2010.

MOHAPATRA, B. R., et al. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. **FEMS Microbiol Lett**, v.277, n.1, p.98-106. 2007.

MUNOZ-PRICE, L. S.WEINSTEIN, R. A. Acinetobacter infection. **N Engl J Med**, v.358, n.12, p.1271-1281. 2008.

NIKAIDO, H.TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochim Biophys Acta**, v.1794, n.5, p.769-781. 2009.

NORDMANN, P.POIREL, L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v.68, n.3, p.487-489. 2013.

NORDMANN, P., et al. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerg Infect Dis**, v.18, n.9, p.1503-1507. 2012.

OLIVE, D. M.BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**, v.37, n.6, p.1661-1669. 1999.

PADOVEZE, M. C.FORTALEZA, C. M. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Rev Saude Publica**, v.48, n.6, p.995-1001. 2014.

PAGANO, M., et al. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAb₁ upstream bla_{OXA-51}-like gene in Porto Alegre, southern Brazil. **Epidemiol Infect**, v.141, n.2, p.330-333. 2013.

PAILHORIES, H., et al. Using Vitek MALDI-TOF mass spectrometry to identify species belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex: a relevant

alternative to molecular biology? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.83, n.2, p.99-104. 2015.

PAJAND, O., et al. Study of the carbapenem resistance mechanisms in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: comparison of burn and non-burn strains. **Burns**, v.39, n.7, p.1414-1419. 2013.

PASANEN, T., et al. Rapid molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clones with rep-PCR and evaluation of carbapenemase genes by new multiplex PCR in Hospital District of Helsinki and Uusimaa. **Plos One**, v.9, n.1, p.e85854. 2014.

PASTERAN, F., et al. Evaluation of the blue-carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. **J Clin Microbiol**, v.53, n.6, p.1996-1998. 2015.

PAUL, M., et al. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **J Antimicrob Chemother**, v.69, n.9, p.2305-2309. 2014.

PELEG, A. Y., et al. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev**, v.21, n.3, p.538-582. 2008.

PINCUS, DAVID H. Microbial identification using the Biomérieux VITEK® 2 system. In: MILLER, MICHAEL J. (Ed.). **Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods**. 2013. v. 4.

PINO, I. C., et al. [Extended spectrum beta lactamases (ESBL) production in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from Chilean hospitals belonging to VIII Region]. **Rev Chilena Infectol**, v.24, n.2, p.137-141. 2007.

PIRES, J., et al. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from

bacterial cultures. **J Clin Microbiol**, v.51, n.12, p.4281-4283. 2013.

PIRES, J., et al. Comparison of the in-house made Carba-NP and Blue-Carba tests: Considerations for better detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **J Microbiol Methods**, v.122, p.33-37. 2016.

POIREL, L., et al. Tn125-related acquisition of blaNDM-like genes in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, n.2, p.1087-1089. 2012.

POIREL, L. NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clin Microbiol Infect**, v.12, n.9, p.826-836. 2006.

POOLE, K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Infect**, v.10, n.1, p.12-26. 2004.

POURNARAS, S., et al. In Vitro Activity of Tigecycline Against *Acinetobacter baumannii*: Global Epidemiology and Resistance Mechanisms. **Adv Exp Med Biol**. 2015.

PRATES, C. G., et al. Risk factors for 30-day mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in an intensive care unit. **Epidemiol Infect**, v.139, n.3, p.411-418. 2011.

QUEENAN, A. M. BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v.20, n.3, p.440-458, table of contents. 2007.

RIVERA, G., et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in a university hospital: Role of inter-hospital transmission. **J Infect Dev Ctries**, v.10, n.1, p.96-99. 2016.

RUMBO, C., et al. Contribution of efflux pumps, porins, and beta-lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.11, p.5247-5257. 2013.

SABAT, A. J., et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveill**, v.18, n.4, p.20380. 2013.

SADER, H. S., et al. Tigecycline activity tested against antimicrobial resistant surveillance subsets of clinical bacteria collected worldwide (2011). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.76, n.2, p.217-221. 2013.

SAEED, S., et al. Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of *Acinetobacter baumannii* detected by molecular analysis: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.27, n.9, p.981-983. 2006.

SAFARI, M., et al. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients of intensive care units (ICU). **Saudi J Biol Sci**, v.22, n.4, p.424-429. 2015.

SANSCHAGRIN, S.YERGEAU, E. Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. **J Vis Exp**, n.90. 2014.

SINHA, M., et al. Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species. **Indian J Med Res**, v.126, n.1, p.63-67. 2007.

SNELLING, A. M., et al. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus* *Acinetobacter baumannii* complex and application of the method

to the investigation of a hospital outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.5, p.1193-1202. 1996.

TAMURA, K., et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol Biol Evol**, v.30, n.12, p.2725-2729. 2013.

TENOVER, F. C., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v.33, n.9, p.2233-2239. 1995.

TSAKRIS, A., et al. Pseudo-outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* resulting from false susceptibility testing by a rapid automated system. **J Clin Microbiol**, v.38, n.9, p.3505-3507. 2000.

TSAKRIS, A., et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. **J Antimicrob Chemother**, v.65, n.8, p.1664-1671. 2010.

VALI, L., et al. Diversity of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* population in a major hospital in Kuwait. **Front Microbiol**, v.6, p.743. 2015.

VAN BELKUM, A., et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13, p.1-46. 2007.

VAN DEN BROEK, P. J., et al. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. **Clin Microbiol Infect**, v.12, n.9, p.837-843. 2006.

VASOO, S., et al. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge

test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. **J Clin Microbiol**, v.51, n.9, p.3097-3101. 2013.

VERSALOVIC, J., et al. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res**, v.19, n.24, p.6823-6831. 1991.

VILA, J., et al. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.59, n.6, p.1210-1215. 2007.

VILLALON, P., et al. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo-beta-lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. **J Antimicrob Chemother**, v.68, n.3, p.550-553. 2013.

WANG, Y. F.DOWZICKY, M. J. In vitro activity of tigecycline and comparators on *Acinetobacter* spp. isolates collected from patients with bacteremia and MIC change during the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial, 2004 to 2008. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.68, n.1, p.73-79. 2010.

WAREHAM, D. W.GORDON, N. C. Modifications to CHROMagar *Acinetobacter* for improved selective growth of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Pathol**, v.64, n.2, p.164-167. 2011.

WERNECK, JÉSSICA SANCHEZ DE FREITAS. **Estudo da Similaridade Genética de Amostras de *Acinetobacter baumannii* Produtoras de Carbapenemases do Tipo OXA Isoladas em Diversos Hospitais Brasileiros** 2010. 100 p. - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

WHO. World Health Organization. **Practical guidelines for infection control in health care facilities**. 2004

WHO. World Health Organization. **Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation.** 2015a

WHO. World Health Organization. **Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance.** 2015b

WOODFORD, N., et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol**, v.48, n.8, p.2999-3002. 2010.

YE, D., et al. A gloves-associated outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit in Guangdong, China. **BMC Infect Dis**, v.15, p.179. 2015.

ZARRILLI, R. *Acinetobacter baumannii* virulence determinants involved in biofilm growth and adherence to host epithelial cells. **Virulence**, p.0. 2016.

ZILBERBERG, M. D., et al. Secular trends in *Acinetobacter baumannii* resistance in respiratory and blood stream specimens in the United States, 2003 to 2012: A survey study. **J Hosp Med**, v.11, n.1, p.21-26. 2016.

APÊNDICE A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RASTREAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES EM AMBIENTE HOSPITALAR

Pesquisador: Thais Cristine Marques Sincero

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 32930514.0.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: NEOPROSPECTA PESQUISA E CONSULTORIA S.A.
Universidade Federal de Santa Catarina

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 745.456

Data da Relatoria: 11/08/2014

Apresentação do Projeto:

O presente projeto de pesquisa será realizado no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis/SC) e no Hospital SOS Cárdio (Florianópolis/SC). Os participantes do projeto serão esclarecidos sobre os seus objetivos e participarão voluntariamente através de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Serão escolhidas quatro unidades em setores distintos dentro dos hospitais, com as seguintes características:- uma unidade de atendimento de emergência;- uma unidade de Terapia Intensiva (UTI);- uma unidade de Centro Cirúrgico (CC);- uma unidade de internação (que recebam pacientes com período de internação maior). Serão realizadas coletas mensais durante 12 meses consecutivos em todos os setores escolhidos. As coletas de todos os setores serão realizadas em dia único, pré-agendado com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), porém sem conhecimento prévio dos setores em questão, evitando assim mudanças na rotina hospitalar que possam interferir na coleta e análise de dados. Os pontos de coleta de cada setor serão determinados após análise prévia à primeira rodada de coletas. A análise prévia observará os aspectos estruturais, o número de profissionais da área da saúde, além do número médio de pacientes atendidos diariamente nas unidades escolhidas dos quatro setores hospitalares. O

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 745.456

número mínimo mensal de amostras por unidade do hospital será de 48, podendo-se realizar pools de pontos de coleta (total de 192 amostras mensais, no mínimo). As coletas de amostras serão realizadas através de swabs com ponta de algodão em meio de cultura apropriado (para aquelas amostras em que serão aplicadas técnicas de microbiologia) ou com tampão de lise celular (para as técnicas moleculares). Os pacientes que aceitarem participar do projeto através do TCLE responderão um questionário específico para coleta de dados. Também será realizada consulta aos prontuários para busca dos dados clínicos dos pacientes participantes. A coleta das amostras clínicas dos pacientes atendidos em cada setor será realizada mediante conhecimento prévio de possíveis situações de infecções. Assim, para pacientes com suspeita de infecção bacteriana serão coletados swabs do sítio da infecção, por exemplo, feridas, região perianal, trato respiratório, etc., além de amostras para verificar a colonização. Para pacientes sem suspeita de infecção, que serão submetidos ao rastreamento para identificação de colonização, serão coletados swabs nasal, da pele, orofaringe e do sítio de inserção do cateter venoso, quando houver. A escolha dos pacientes levará em consideração o histórico de infecções, os antecedentes de internação, o sítio cirúrgico (no caso de pacientes submetidos a cirurgias) e tempo de internação (preferência para pacientes internados por longo período). A coleta das amostras da equipe de profissionais da saúde de cada setor será realizada para rastreamento de colonização. Os profissionais participantes do projeto também assinarão um TCLE e serão submetidos a questionário específico. Serão coletados swabs das mãos, nasal, de orofaringe e da vestimenta utilizada em serviço de profissionais escolhidos no dia da coleta (não necessariamente os mesmos durante os 12 meses de coleta). A coleta das amostras dos ambientes de cada unidade será realizada com base na análise prévia, mantendo-se os mesmos pontos de coleta a cada mês. Serão coletados swabs de equipamentos médico-hospitalares, de móveis e acessórios dos leitos e de pontos críticos da estrutura. Será realizado questionário específico com o responsável pelo ambiente do setor a ser coletado, para se obter informações relativas aos procedimentos rotineiros de limpeza e desinfecção concorrente e terminal, cuidados ao paciente, métodos de precaução de contato em caso de infecções, etc.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar um programa de rastreamento, identificação e caracterização molecular de isolados dos principais grupos de bactérias de importância clínica, provenientes de amostras de pacientes, de

Endereço:	Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima		
Bairro:	Trindade	CEP:	88.040-900
UF:	SC	Município:	FLORIANOPOLIS
Telefone:	(48)3721-9206	Fax:	(48)3721-9696
		E-mail:	cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 745.456

profissionais da área da saúde e do ambiente hospitalar, e determinar o perfil de resistência desses isolados, utilizando técnicas clássicas e moleculares.

Objetivo Secundário:

- Identificar isolados de bactérias de importância clínica em amostras de pacientes, profissionais da área da saúde e dos ambientes de diferentes setores dos hospitais através de técnicas clássicas de microbiologia (cultura) e técnicas moleculares (PCR e sequenciamento);- Determinar o perfil de resistência dos isolados identificados através de técnicas clássicas (antibiograma) e detecção molecular de genes de resistência por PCR em tempo real e sequenciamento;- Caracterizar cepas multirresistentes através da técnica de sequenciamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Não há riscos iminentes para a realização do presente projeto, uma vez que o estudo nos hospitais será observacional e os experimentos laboratoriais serão conduzidos em ambientes próprios, segundo as normas de biossegurança previstas, com pessoal habilitado e treinado e produtos e insumos dentro dos padrões de qualidade."

Benefícios:

O presente projeto pretende contribuir com a melhoria da qualidade e do tempo de resposta para a identificação de agentes resistentes aos antimicrobianos causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), uma vez que a resistência sempre se mostra desafiadora em termos de controle e tratamento, principalmente em surtos hospitalares. Em artigo publicado recentemente, Fournier e colaboradores (2013) relatam que, ao se comparar técnicas mais tradicionais de detecção, uma abordagem mais ampla de procura parece em um primeiro momento desvantajosa; porém, o aumento dos custos laboratoriais podem ser balanceados pela redução do tempo de internação devido ao diagnóstico mais rápido e a utilização precoce do antibiótico apropriado. A introdução das tecnologias chamadas

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 745.456

ômicas

(genômica, proteômica, transcriptômica e metabolômica) em laboratórios de microbiologia clínica se apresentam como novos desafios, sobre como obter um diagnóstico no menor tempo possível para um tratamento e tomada de decisão eficientes. No caso das IRAS, o poder de detecção precoce, a rapidez na resposta diagnóstica e a acurácia metodológica são primordiais e podem fazer a diferença entre o sucesso e o fracasso do controle de surtos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo adequadamente escrito, com os métodos empregados consoante com os objetivos. Tem relevância social e acadêmica e completadas as adequações realizadas no TCLE, tem cumprido as boas práticas da pesquisa com seres humanos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A documentação exigida pelo sistema CEP-CONEP estão presentes e na versão presente o TCLE está adequado. No encaminhamento a pendência a este Comitê as dúvidas foram esclarecidas.

Recomendações:

Nenhuma recomendação é necessária.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Concluímos com a recomendação de aprovação para o presente estudo, uma vez que as pendências demandadas por este Comitê foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 745,456

FLORIANOPOLIS, 11 de Agosto de 2014

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

