UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

***CAMPUS* DE SOBRAL**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

IZABELLY LINHARES PONTE BRITO

DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES EM HOSPITAIS DE ENSINO DO CEARÁ

SOBRAL

2018

IZABELLY LINHARES PONTE BRITO

DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES EM HOSPITAIS DE ENSINO DO CEARÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa

SOBRAL

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B875d Brito, Izabelly Linhares Ponte.
Diversidade genômica de isolados nosocomiais de acinetobacter baumannii multirresistentes produtores de carbapenemases em hospitais de ensino do ceará / Izabelly Linhares Ponte Brito. – 2018.
97 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa.

1. Acinetobacter baumannii. 2. Beta-lactamases. 3. Carbapenemases. 4. Infecção hospitalar. 5. Resistência antimicrobiana. I. Título.

CDD 610

IZABELLY LINHARES PONTE BRITO

DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES EM HOSPITAIS DE ENSINO DO CEARÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Microbiologia Aplicada.

Aprovada em:____/_____/_____.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - *Campus* de Sobral

_____
Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto (Examinador)
Universidade Federal do Ceará - *Campus* de Sobral

_____
Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos (Examinadora)
Universidade Federal do Ceará - *Campus* de Sobral

DEDICATÓRIA

A Deus e Nossa Senhora, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Ao meu esposo Luiz Antunes Martins Brito, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigado pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria do mestrado.

Aos meus pais, João Arruda Linhares Ponte Filho e Ana Fátima Linhares Ponte que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até essa etapa de minha vida, pelo amor com que me mostraram a direção correta e me ensinaram a ter fé na vida.

Aos meus filhos Luiz Eduardo Linhares Brito e João Vitor Linhares Brito por todo amor e carinho.

As minhas irmãs, Rafaela Linhares Ponte Rangel e Gabriela Linhares Ponte, pelo incentivo incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, pela oportunidade que tive de aprender e por poder colaborar com produção científica para o bem da sociedade.

À Santa Casa de Misericórdia de Sobral pelo suporte financeiro para esta pesquisa através do Edital DEPE 06/2016.

Aos hospitais de ensino Santa Casa de Misericórdia de Sobral, Hospital Geral de Fortaleza (Dra. Liduína e a técnica Lucineide), Hospital Geral César Cals (Dr. Daniel e o técnico Leandro) e Hospital Universitário Walter cantídio (Dr. Paulo Cesar) pela gentileza com o isolamento, triagem e estoque das amostras bacterianas.

Ao professor Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa, meu orientador pela paciência na orientação e incentivo.

Ao professor Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto que muito me incentivou a participar desse programa de Pós-graduação.

Aos meus colegas da vida acadêmica que tanto colaboraram para concretização dessa pesquisa: Jéssica Morais, Xhaulla Fonseca e Paulo de Tarso.

À minha amiga e incentivadora Ana kélvia, pelo companheirismo e cumplicidade.

“Nunca foi sorte, sempre foi Deus.”

Lourdes Sousa

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um patógeno oportunista que causa infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), com altas taxas de morbimortalidade, comumente associado a surtos de infecções nosocomiais. Este microrganismo é intrinsicamente resistente a vários antimicrobianos, sendo que o mecanismo mais comum de resistência aos carbapenêmicos é a degradação enzimática por carbapenemases, como as oxacilinases. Este estudo teve como objetivo analisar a frequência e o perfil de sensibilidade antimicrobiana de *A. baumannii* isolados de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar na Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS), no Hospital Geral de Foraleza (HGF), no Hospital Geral César Calls (HGCC) e no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), entre novembro de 2016 e abril de 2017, assim como realizar a detecção dos genes de resistência bla_{OXA-51}, bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24} e bla_{OXA-58} nesses isolados. A identificação e o TSA (Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos) foram determinados pelo sistema automatizado (Vitek2®; bioMérieux), para confirmação da identidade dos espécimes foi amplificado o gene bla_{OXA-51} e para os isolados resistentes à tigeciclina foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo. As espécies nosocomiais de *A. baumannii* foram analisados para a detecção dos genes bla_{OXA} por PCR. No total, 167 isolados de *A. baumannii* foram investigados. Desses, 54 (32,3%) eram oriundos de amostras de sangue e 42 (25,1%) de aspirado traqueal, sendo que 101 (60,5%) dos isolados eram oriundos da UTI. Os dados demonstraram que 132 (79%) dos isolados de *A. baumannii* eram resistentes aos carbapenêmicos e todos foram sensíveis à colistina. O gene bla_{OXA-23} foi detectado em 78 (46,7%) e o bla_{OXA-24} em 45 (26,9%), enquanto o bla_{OXA-58} não foi detectado em nenhum dos microrganismos analisados. Os genes bla_{OXA-23} e bla_{OXA-24} foram encontrados em 4 isolados, simultaneamente. Os resultados desse estudo demonstraram que a maioria dos espécimes nosocomiais de *A. baumannii* foram isolados de amostras de sangue, de pacientes internados na UTI e demonstraram altas taxas de resistência aos carbapenêmicos e sensibilidade à colistina e tigeciclina, podendo ser esses fármacos opções terapêuticas no tratamento de infecções causadas por esse patógeno. Além disso, o gene bla_{OXA-51} foi o subgrupo prevalente e bla_{OXA-23} o gene adquirido predominante entre os isolados de *A. baumannii* MDR. Contudo, houve diferenças no sítio de isolamento e na prevalência do subgrupo do gene bla_{OXA} dependendo do hospital analizado.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; β-lactamases; Carbapenêmicos; Infecção hospitalar; Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii*is an opportunistic pathogen resistant to several antimicrobials. We aimed to investigate the sensitivity profile and frequency of OXA-type carbapenemases among *A. baumannii* nosocomial strains isolated from patients in teaching hospitals of Ceará, Brazil.From November 2016-April 2017, *A. baumannii* nosocomial strains from four teaching hospitals were analyzed. All isolates were identified, and the antimicrobial susceptibility profile established by VITEK®2. Polymerase chain reaction (PCR) to amplify the $bla_{\text{OXA-51}}$ gene was performed on all presumptively strains identified as *A. baumannii*, and minimum inhibitory concentrations were determined by the broth microdilutionfor tigecycline-resistant isolates. Furthermore, $bla_{\text{OXA-23}}$, $bla_{\text{OXA-24}}$, and $bla_{\text{OXA-58}}$ genes were detected by PCR.

A total of167 *A. baumannii* nosocomial strains were analyzed, from which 101 (60.5%) were from patients in intensive care units, 54 (32.3%) were isolated from thebloodstream, and 142 (85.0%) were multi-drug resistant (MDR). 132 (79.0%) isolates were resistant to carbapenems, but all isolates were susceptible to colistin and most of them were susceptible to tigecycline. The majority harbored the $bla_{\text{OXA-23}}$ gene, these data were significantly associated with an MDR phenotype. In addition, 45 (26.9%) contained $bla_{\text{OXA-24}}$, four strains harbored concomitantly $bla_{\text{OXA-23}}$ and $bla_{\text{OXA- 24}}$ and no$bla_{\text{OXA-58}}$ geneswere detected.**T**hese results demonstrated high resistance rates to the different antimicrobial drugs analyzed and a high frequency of $bla_{\text{OXA-23}}$ gene, suggesting that colistin and tigecycline could be the therapeutic options for the treatment of infections associated with MDR*A. baumannii*.

Keywords: Acinetobacter baumannii; beta-lactamases; carbapenems; cross infection; antimicrobial drug resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Epidemiologia global de *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos..... 22

Figura 2- Distribuição do gene *bla* $_{OXA}$ em isolados de *A.baumannii* no Brasil..... 29

Figura 3- Eletroforese em gel de agarose contendo fragmentos do gene *bla* $_{OXA-51}$ oriundos de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de hospitais de ensino do Ceará amplificadas por PCR - PM 100 pb (Invitrogen, EUA)..... 44

Figura 4- Eletroforese em gel de agarose contendo fragmentos do gene *bla* $_{OXA-23}$ oriundos de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de hospitais de ensino do Ceará amplificadas por PCR - PM 100 pb (Invitrogen, EUA)..... 44

Figura 5- Eletroforese em gel de agarose contendo fragmentos de gene *bla* $_{OXA-24}$ oriundos de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de hospitais de ensino do Ceará amplificadas por PCR - PM 100 pb (Invitrogen, EUA)..... 45

Figura 6- Eletroforese em gel de agarose contendo fragmentos de gene *bla* $_{OXA-58}$ oriundos de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de hospitais de ensino do Ceará amplificadas por PCR - PM 100 pb (Invitrogen, EUA)..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- *Primers* para amplificação dos genes *bla* $_{OXA}$..... 35

Tabela 2- Distribuição de isolados nosocomiais de *A. baumannii* por unidade hospitalar, sítio de isolamento, setor de hospitalização, gênero e frequência dos genes *bla* $_{OXA-23}$ e *bla* $_{OXA-24}$..... 37

Tabela 3- Perfis de resistência antimicrobiana dos isoaldos nosocomiais de *A. baumannii* dos quatro hospitais de ensino analisados..... 39

Tabela 4- Perfis de resistência antimicrobiana e frequência dos genes *bla* $_{OXA-23}$ e *bla* $_{OXA-24}$ dos isoaldos nosocomiais de *A. baumannii* dos quatro hospitais de ensino analisados..... 46

Tabela 5- Frequência de detecção dos genes *bla* $_{OXA-23}$, *bla* $_{OXA-24}$, *bla* $_{OXA-51}$ e *bla* $_{OXA-58}$ em relação ao perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos na SCMS, HGF, HGCC e HUWC..... 49

Tabela 6- Frequência dos genes *bla* $_{OXA-23}$ e *bla* $_{OXA-24}$ por unidade hospitalar, sítio de isolamento, setor de hospitalização e gênero..... 50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição por sítio de isolamento de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* identificadas de novembro de 2016 a abril de 2017 em hospitais de ensino do Estado do Ceará..... 38

Gráfico 2- Distribuição de isolados nosocomiais de *A.baumannii* identificados de novembro de 2016 a abril de 2017 de acordo com o setor de hospitalização em hospitais de ensino do Estado do Ceará..... 38

Gráfico 3- Sensibilidade a antimicrobianos de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de novembro de 2016 a abril de 2017 na SCMS..... 40

Gráfico 4- Sensibilidade a antimicrobianos de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de novembro de 2016 a abril de 2017 no HGF..... 41

Gráfico 5- Sensibilidade a antimicrobianos de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de novembro de 2016 a abril de 2017 no HGCC..... 42

Gráfico 6- Sensibilidade a antimicrobianos de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de novembro de 2016 a abril de 2017 no HUWC..... 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Ampicilina
AMP/SUB	Ampicilina Sulbactam
BHI	Brain Heart Infusion
CAZ	Ceftazidima
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFO	Cefoxitina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Comissão Interna de Pesquisa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLT	Controle
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
COL	Colistina
COM	Cefepima
CRO	Ceftriaxona
CRX	Cefuroxima
CRX/AXETIL	Cefuroxima/ Axetil
dATP	desoxiCitidina Trifosfatada
dCTP	desoxiCitidina Trifosfatada
dGTP	desoxiGuanosina Trifosfatada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dTTP	desoxiTimidina Trifosfatada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	β-lactamase de espectro estendido
GEN	Gentamicina
GES	Guiana Extended Spectrum
GN	Gram-negativo
HGCC	Hospital Geral César Cals
HGF	Hospital Geral de Fortaleza
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio

H_2O	Água
IH	Infecção hospitalar
IRAS	Infecções relacionadas a assistência à saúde
ISs	Sequências de inserção
IMP	Imipenemase
IMI	Imipenem-hidrolisando β-lactamase
KCl	Cloreto de potássio
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
LAMP	Laboratório de microbiologia e parasitologia
MBL	Metalo-β-lactamases
MDR	Multidroga resistente
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
NDM	Metalo-β-lactamase Nova Dehli
NMC-A	Não metaloenzima carbapenemase A
OmpA	Proteína de membrana externa A
OXA	Oxacilinase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDR	Pan-resistentes
RNA	Ácido ribonucleico
SCMS	Santa Casa de Misericórdia de Sobral
SME	Enzima de *Serratia. Marcescens*
SHV	Sulfhydryl-Variable β-Lactamase
TBE	Tris/Borato/EDTA
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de terapia intensiva
VIM	Verona integron-encoded metallo-β-lactamase
XDR	Extremamente resistente

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior que
≥	Maior ou igual
®	Marca registrada
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
ºC	Grau Celsius
U	Unidades
β	Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 17
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 21
2.1 *Acinetobacter baumannii*..... 21
2.2 Resistência a antimicrobianos..... 23
2.3 Carbapenemases..... 24
2.3.1 Carbapenemases Classe A..... 24
2.3.2 Carbapenemases Classe B..... 24
2.3.3 Carbapenemases Classe C (AmpC)..... 25
2.3.4 Carbapenemases Classe D..... 25
2.4 Família OXA..... 27
3 OBJETIVOS..... 30
3.1 Objetivo Geral..... 30
3.2 Objetivos específicos..... 30
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 31
4.1 Aspéctos éticos..... 31
4.2 Tipo de estudo..... 31
4.3 Coleta de dados..... 31
4.4 Delineamento experimental..... 33
4.5 Critérios de inclusão e exclusão..... 33
4.6 Reativação dos isolados..... 34
4.7 Detecção e identificação dos genes *bla* OXA 34
4.8 Reação em Cadeia da Polimerase..... 35
4.9 Análise Estatística..... 35
5 RESULTADOS..... 37
6 DISCUSSÃO..... 51
7 CONCLUSÃO..... 54
ARTIGO..... 55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 71
APÊNDICE..... 79
ANEXOS 80

1. INTRODUÇÃO

Infecção hospitalar (IH), 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, 1998). 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 (PADOVEZE, FORTALEZA, 2014).

No Brasil, apesar de não haver uma sistematização dos dados, estima-se que aproximadamente de 5% a 15% dos pacientes hospitalizados e de 25% a 35% dos pacientes admitidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) adquiram algum tipo de IRAS sendo esta, em geral, a quarta causa de mortalidade (OLIVEIRA *et al*., 2016; LORENZINI *et al*., 2013).

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 sp*. Eles causam ampla gama de infecções, como bacteremia, pneumonia, infecções cutâneas e de tecidos moles e infecções do trato urinário. Infecções causadas por *P. aeruginosa* e *A. baumannii* com fenótipos multi, extremamente e pan-resistentes (MDR, XDR e PDR), são desafiadoras e difícil de tratar, resultando em aumento dos custos de internação, hospitalização prolongada e, principalmente, aumento das taxas de morbidade e mortalidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. O tratamento de infecções causadas por essas bactérias tem aumentado e é um desafio comum na maioria dos hospitais (EVANS *et al*., 2007; PRAGASAM *et al*., 2016).

A resistência de bactérias aos antibióticos e outras drogas antimicrobianas é um fenômeno natural e de pressão seletiva, mas que devido ao seu uso indiscriminado e recorrente, tornou-se um problema de saúde pública (OLIVEIRA, 2016). No Brasil, foram identificados isolados de *A. baumannii* resistentes 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 (FERREIRA *et al*., 2011).

Dentre os mecanismos de resistência, destacam-se a reduzida permeabilidade da membrana externa bacteriana, perda de porinas, alteração nos sítios de ligação dos antibióticos, hiperexpressão de bombas de efluxo e produção de β-

lactamase. No entanto, o mecanismo que mais contribui para a rápida disseminação de cepas multirresistentes dentro de ambientes hospitalares é a aquisição de genes de resistência e produção de enzimas β-lactamases, as quais se propagam principalmente por plasmídeos, transposons ou integrons, e do elemento de inserção ISAba1 localizado entre os genes de resistência como *bla* $_{OXA-23}$, *bla* $_{OXA-24}$ e *bla* AmpC que têm sido associados a um aumento na resistência aos carbapenêmicos (MARTINS *et al*., 2015).

Existem relatos que o mecanismo mais comum de resistência às drogas é a capacidade de algumas bactérias em hidrolisar β-lactamases, incluindo metalo-β–lactamases de classe B e oxacillinases (carbapenemases de classe D) (SOARES *et al*., 2012). O uso generalizado de antimicrobianos de amplo espectro tem desempenhado um papel importante no aparecimento de carbapenemases de classe D com capacidade de hidrolizar β-lactamases, que têm sido amplamente identificadas em *A. baumannii*. Recentemente, o gene que codifica este enzima tem sido identificado em plasmídeos, o que permite que ele se espalhe entre as várias espécies de *Acinetobacter* (MA *et al*., 2015). 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 (TARTARI *et al*., 2016).

Carbapenemases são β-lactamases com capacidades hidrolíticas versáteis. Apresentam a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, e carbapenêmicos. Atualmente, a propagação de microrganismos produtores de carbapenemases especialmente bactérias Gram-negativas é um problema de saúde pública de grande importância e deve ser investigado a fim de controlar sua disseminação (BIALVAEI *et al*., 2015).

Foram identificadas quatro classes moleculares diferentes de carbapenemases: A, B, C, e D, das quais as classes A, B e D são as de maior relevância clínica. As classes A, C, e D são carbapenemases que contêm o aminoácido serina no local ativo. A classe de carbapenemases B, também conhecida como um subgrupo de metalo- β-lactamases, contém pelo menos um átomo de zinco no seu local ativo (DORTET *et al*., 2014; MA *et al*., 2015).

Entre as carbapenemases adquiridas, enzimas do grupo OXA são as mais comumente encontradas em todo o mundo e, apresentam mais de 400 variantes conhecidas (VIEHMAN *et al*.,2015). Pelo menos 121 variantes diferentes de classe D β-

lactamases têm sido identificadas em nível de proteína e, 45 destas variantes hidrolizam carbapenêmicos. Atualmente, nove principais subgrupos de carbapenemases OXA foram identificados com base em homologias de aminoácidos. Quatro subgrupos de OXA com atividade de carbapenemases, incluindo OXA-23, OXA-24, OXA-51 e OXA-58, são predominantes em *A. baumannii*. (LIN & LAN, 2014). Desses, o grupo OXA-23 é amplamente disseminado e, é a causa mais frequente de resistência a carbapenêmicos clinicamente relevante em *A. baumannii* (DORTET *et al*., 2014; MA *et al*., 2015).

A taxa de resistência aos carbapenêmicos em isolados *A. baumannii* está aumentando mundialmente (CHUANG *et al*., 2014). Dois fatores fundamentais que contribuem para a difusão significativa de *A. baumannii* em hospitais de todo o mundo são a extensão de sua resistência antimicrobiana e sua capacidade de sobreviver em ambientes hospitalares (TUON *et al*., 2015).

A incidência de carbapenemases, assim como o tipo de enzima predominante varia entre os países, parcialmente em função da relação de troca da população entre as regiões e os possíveis reservatórios de cada carbapenemase, mesmo entre hospitais da mesma região (DJAHMI *et al*., 2014), sendo importante a realização de estudos epidemiológicos locais com finalidade de melhorar a detecção de cepas produtoras, bem como alertar os clínicos sobre a possibilidade de falha na terapia com β-lactâmicos.

As taxas de infecção hospitalar em hospitais de ensino frequentemente são maiores do que em outros equipamentos de saúde, provavelmente pelo tempo de permanência dos pacientes, pela movimentação dos profissionais e estudantes, ressalta- se ainda que infecções hospitalares causadas por bactérias multirresistentes estejam associadas com aumento dos custos de internação, hospitalização prolongada e, principalmente, aumento das taxas de morbidade e mortalidade (JIA *et al.*, 2015).

Desta forma, ressalta-se a importância de uma investigação do perfil de sensibilidade antimicrobiana e da diversidade genômica dos isolados nosocomiais de *A. baumannii* em hospitais de ensino porque a geração dessas informações poderá ser útil para o controle da disseminação desses patógenos nos e entre os hospitais pesquisados, implicando diretamente nos eixos de Segurança do Paciente e melhorando a qualidade da assistência. Além disso, essas informações poderão auxiliar na implantação e/ou na

reavaliação das políticas de saúde voltadas para prevenção de contato com pacientes infectados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Acinetobacter baumannii

O gênero *Acinetobacter* remonta ao início do século 20, em 1911, quando Beijerinck, um microbiologista holandês, descreveu um organismo chamado *Micrococcus calco-Aceticus* que foi isolado a partir do solo por enriquecimento em um meio mínimo de cálcio contendo acetato (BEIJERINCK, 1911).

A designação do gênero atual *Acinetobacter*, foi inicialmente proposta por Brisou e Prévot em 1954 para separar os microrganismos com motilidade, dentro do gênero *Achromobacter* (BRISOU *et al*., 1954). Foi somente até em 1968 que está designação de gênero tornou-se mais amplamente aceita. Em 1968 uma pesquisa concluiu que as diferentes espécies possuíam essa característica semelhante e foram listadas pertencentes a um único gênero, para o qual o nome *Acinetobacter* foi proposto, e que mais subclassificações em espécies diferentes com base em características fenotípicas não eram possíveis (BAUMANN *et al*., 1968).

O gênero *Acinetobacter* é caracterizado por cocobacilos gram-negativos imóveis, catalase positivos, oxidase-negativos e não fermentadores, classificado como integrante da família *Moraxellaceae*, da ordem *Gammaproteobacteria* (VIEIRA, PICOLI, 2015). 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). Este gênero compreende 26 espécies nomeadas e nove espécies genômicas, sendo que quatro espécies de *Acinetobacter* (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pitti e Acinetobacter nosocomialis*) são referidas como complexo *A. baumannii-calcoaceticus* por apresentarem características fenotípicas análogas. Dentre as espécies citadas, *A. baumannii* é a mais prevalente clinicamente (VIEIRA, PICOLI, 2015).

A. baumannii é um patógeno oportunista comumente associado a surtos de infecções nosocomiais, com incidência mais elevada em unidades de terapia intensiva (UTIs). Esta bactéria apresenta mecanismos que facilitam a colonização de pacientes e de equipamentos hospitalares, como a formação de biofilmes por ação das proteínas da membrana bacteriana externa A – OmpA, um fator-chave na descrição da patogênese deste microrganismo (VIEIRA, PICOLI, 2015). Além disso, sua habilidade em sobreviver em uma variedade de condições, em ambientes úmidos e secos bem como

em alimentos e em pele saudável como, por exemplo, nas mãos de manipuladores de alimentos e profissionais da saúde e persistir por longos períodos em superfícies o faz uma frequente causa de surtos de infecção hospitalar (ABBOTT *et al*., 2013; KEMPF, ROLAIN, 2012).

A. baumannii é intrinsicamente resistente a vários antimicrobianos, dentre eles as penicilinas, ampicilinas, macrolídeos, cefalosporinas de segunda e terceira geração, ciprofloxacina e cloranfenicol (TARTARI, 2016). Até a década de 1970, a maioria dos isolados clínicos deste patógeno era suscetível a muitos antibióticos disponíveis, incluindo β-lactâmicos, como carbapenenêmicos. No entanto, este microrganismo apresentou uma elevada capacidade de desenvolver resistência contra antibióticos, o que resultou, na última década, em uma elevação da incidência de cepas multirresistentes desta bactéria em todo o mundo (**Figura 1**) e associação com altos índices de mortalidade (VIEIRA, PICOLI, 2015).

Figura 1- Resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter baumannii* em diferentes países

FONTE: Tartari, 2016.

2.2 Resistência a antimicrobianos

A resistência das diversas espécies bacterianas aos antimicrobianos pode variar entre países, regiões e de acordo com a origem do microrganismo, que pode ser hospitalar ou comunitária e pode ser um fenômeno genético ou não. Os fenômenos genéticos estão relacionados com a existência de genes ou elementos móveis (plasmídeos, transposons e integrons) presentes nos microrganismos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos impedindo a ação das drogas sendo conhecido como resistência adquirida (CHROMA; KOLAR, 2010).

Os plasmídeos são elementos extracromossomais de DNA circular presentes em bactérias, capazes de se replicar independente do hospedeiro. Dessa forma, a resistência proveniente de alterações fisiológicas ou estruturais pode ser levada a diversos ambientes e de diversas formas, principalmente através da transferência horizontal de genes de resistência dentro dos plasmídeos (MATHERS *et al*., 2015), afetando os mais variados organismos sejam eles aquáticos e/ou terrestres (KÜMERER, 2009b).

O fenômeno não genético é aquela resistência que ocorre de forma natural dentro de uma espécie ou gênero bacteriano, sendo a chamada resistência intrínseca ou natural (CHROMA, KOLAR, 2010). Em alguns casos, a resistência natural a um determinado antibacteriano é uma característica indispensável à autodefesa e proteção dos microrganismos produtores de antibióticos, sendo esses produzidos frente à competição com outras bactérias pelo mesmo habitat (BRIGOTTI *et al*., 2010).

Há três principais formas estratégicas que os microrganismos podem desenvolver resistência às drogas: 1) produzindo uma enzima que destrua o antimicrobiano; 2) alterando o alvo molecular de ligação do antimicrobiano; 3) evitando a chegada do antimicrobiano ao alvo (através de bombas de efluxo ou permeabilidade de membrana). De forma geral, após o microrganismo encontrar a sua melhor estratégia, os novos genes que conferem resistência, são disseminados entre aqueles de sua espécie e até mesmo para microrganismos de outras espécies, caso o gene esteja localizado dentro de um elemento móvel como o plasmídeo. Em bactérias Gram-negativas o mais comum é uma combinação das estratégias 1 (através da produção de enzima) e 3 (bomba de efluxo ou permeabilidade de membrana) (OLIVEIRA, 2016). As resistências aos β-lactâmicos, em alguns casos, podem estar associadas à diminuição da

permeabilidade da membrana externa com super expressão de β-lactamases ou expressão de carbapenemases (NORDMANN *et al*., 2011).

A disseminação de resistência aos carbapenêmicos ocorre devido à produção de enzimas carbapenemases. Essas diferentes enzimas estão muito relacionadas com organismos com perfil de resistência a múltiplas drogas, como é o caso da *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* sp., que ao adquirirem uma carbapenemase, podem se tornar vetores de transmissão dessas enzimas a alguns membros da família *Enterobacteriaceae* (THOMSON, 2010).

A resistência devido à produção de carbapenemases em diversos isolados, frequentemente, está acompanhada de outro fator de resistência como a produção de ESBL (β-lactamases de Espectro Ampliado) (DIENSTMANN *et al*., 2010; NORDMANN *et al*., 2012).

2.3 Carbapenemases

2.3.1 Carbapenemase Classe A

As carbapenemases da classe A, hidrolisam todos os β-lactâmicos e sua atividade pode ser inibida parcialmente por ácido clavulânico, tazobactam e ácido borônico (NORDMANN *et al*., 2013). Ainda, hidrolisam as penicilinas e cefalosporinas mais eficientemente que os carbapenêmicos (BUSH *et al*., 1995).

Nessa classe, estão incluídas as famílias KPC, IMI e SME e as enzimas NMC-A e algumas GES; e estas podem ser produzidas por membros da família *Enterobacteriaceae* (THOMSON, 2010).

2.3.2 Carbapenemase Classe B

As metalo-β-lactamases são capazes de hidrolisar todos os β-lactâmicos exceto o aztreonam e somente podem ser inibidas por quelantes de zinco, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o ácido dipicolínico (MATHERS *et al*., 2015). Os inibidores de uso clínico e comercial como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam, não conseguem afetar sua atividade (NORDMANN *et al*., 2013). O seu mecanismo de hidrólise é dependente de uma interação entre o β-lactâmico e íons de zinco em seu sítio ativo (NORDMANN *et al*., 2012 B; QUEENAN, BUSH, 2007).

As metalo-β-lactamases incluem NDM, VIM e IMP e a SPM-1 esta última descrita pela primeira vez em São Paulo (TOLEMAN *et al*., 2002). Essas enzimas têm sido encontradas em alguns membros da família *Enterobacteriaceae, P. aeruginosa e A. baumanii* (THOMSON, 2010). Outros membros desta família são GIM e SIM, cujos genes estão localizados em integrons e quando estes genes estão associados a plasmídeos ou transposons, sua transferência se torna fácil (NORDMANN *et al*., 2012).

2.3.3 Carbapenemase Classe C (AmpC)

A filogenia indica que as enzimas AmpC e β-lactamase das classes A e D divergiram de um ancestral comum, mas que as AmpCs antecederam a esta divergência (JACOBY, 2009). A superexpressão constitutiva de β-Lactamases AmpC em organismos Gram-negativos pode ocorrer tanto pela desregulação do gene cromossômico ampC ou por aquisição de um gene ampC através de um elemento móvel (plasmídeo) (PÉREZ-PÉREZ, HANSON, 2002). Algumas variedades das famílias de AmpC, determinadas por genes cromossômicos, podem ser possíveis progenitores das enzimas determinadas por genes em plasmídeos (JACOBY, 2009).

As β-lactamases AmpC, tanto cromossomal (quando hiperproduzida) quanto mediada por plasmídeo, hidrolisam penicilinas, cefalosporinas de espectro estreito e estendido e cefamicinas e não são inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (JACOBY, 2009; THOMSON, 2010). Estas enzimas têm sido encontradas em vários membros da família *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes, Proteus mirabilis* e *Esherichia coli* (JACOBY, 2009). As β-lactamases AmpC possuem vários integrantes, mas as mais encontradas são as das famílias CMY, FOX e DHA e estão sempre associadas a multirresistência (THOMSON, 2010), dentre essas, a enzima AmpC mais comum é CMY-2 (JACOBY, 2009).

2.3.4 Carbapenemase Classe D

As oxacilinases (OXAs) são capazes de hidrolisar penicilinas e carbapenêmicos, mas não conseguem hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefepime) (NORDMANN *et al*., 2012) ou, quando hidrolisam, o fazem até uma determinada concentração (TÄNGDÉN, GISKE, 2015).

As OXAs que são comumente produzidas por *Acinetobacter* sp., são codificadas por genes localizados em plasmídeos (QUEENAN, BUSH, 2007). Essas enzimas também têm sido detectadas em *P. aeruginosa, K. pneumoniae e E. coli* (THOMSON, 2010). Nas enterobactérias o tipo de enzima mais comumente encontrado é OXA-48 e ainda OXA-163 que têm sido identificadas em alguns países da América do Sul (MATHERS *et al*., 2015). Cabe ressaltar que o tipo OXA-48 não é encontrado em bactérias não fermentadoras, portanto não está relacionada com as OXAs encontradas em *Acinetobacter* sp. (TÄNGDÉN, GISKE, 2015).

A transcrição de genes β-lactamases é reforçada por diferentes sequências de inserção (ISs) localizadas em sua proximidade. As ISs mais comumente associada com genes de carbapenemases em *A. baumannii* multiresistente são ISaba 1, ISaba 2, ISaba 3, ISaba 4 e IS18 (KUO *et al.*, 2014).

Embora as sequências ISAba1 sejam comumente detectadas nos genomas de ambas as linhagens suscetíveis e resistentes aos carbapenêmicos, a inserção de sequências ISAba1 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).

Apeser das carbapenemases de classe D hidrolisar fracamente os carbapenêmicos, elas podem conferir resistência quando superexpressas. Esta resistência é mediada por meio de uma combinação natural de baixa permeabilidade para β-lactâmicos, superexpressão de bombas de efluxo e elementos ISAba 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 ISAba1, conferindo maior resistência (KUO *et al*., 2014).

A identificação de um gene que codifica para as β-lactamases de classe D foi relatada pela primeira vez em *A. baumannii* em 1955. Essa enzima, originalmente denominada ARI-1, foi identificada na Escócia e foi encontrada em um plasmídio (ABBOTT *et al*., 2013; PELEG *et al*., 2008). Essa enzima foi renomeada como OXA- 23 após a sua caracterização genética e bioquímica. Um segundo grupo de β-lactamases de classe D, que compreende OXA-24, OXA-25, OXA-26 e OXA-40, compartilham 63% e 60% de identidade aminoacídica com OXA-51/69 e OXA-23, respectivamente.

Um terceiro grupo de carbapenemase de classe D contém OXA-58, que compartilha 59% dos aminoácidos com OXA-51/69 e < 50% com outras carbapenemases de classe D (POIREL; NORDMANN, 2006).

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). 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 carbapenemase de Classe D, pertencentes ao *cluster bla* $_{OXA-24}$, parecem ser localizados apenas cromossomicamente. Análises de sequências têm indicado que o elemento ISAba1, pertencente à família IS4, é identificado a montante do gene *bla* $_{OXA-23}$, independentemente da origem geográfica do isolado. Outro elemento, ISAba4, 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).

2.4 Família OXA

As oxacilinases (OXAs) são enzimas que pertencem à classe D de Ambler e apresentam o resíduo de aminoácido de serina no seu sítio ativo, inativam principalmente os antimicrobianos carbapenêmicos e algumas cefalosporinas, como a cefepima; no entanto não há ação hidrolítica quando o substrato é a ceftazidima (BROWN; AMYES, 2006). Uma característica marcante deste grupo de enzimas é o fato de serem fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, mas fortemente inibidas *in vitro*, pelo cloreto de sódio (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010). Mais de 150 variantes distintas de enzimas da classe D já foram descritas, contudo apenas 45 destas exibem a capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico dos carbapenêmicos. Avaliando a identidade entre as sequências de aminoácidos das variantes das enzimas do tipo OXA, é possível identificar nove subgrupos (WALTER-RASMUSSEN, HOIBY, 2006).

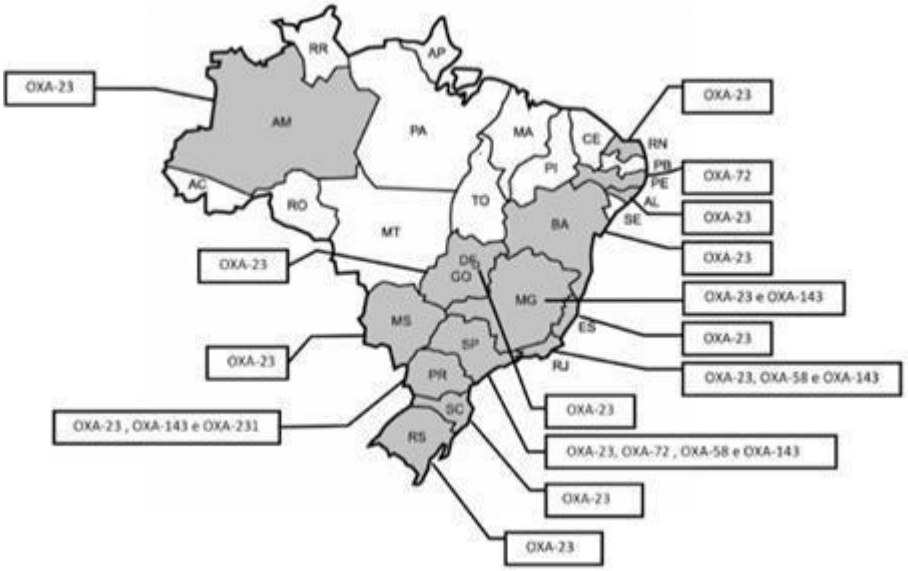
Paton *et al*. (1993) descreveram a primeira OXA β-lactamase com atividade de carbapenemase em 1993 (KARMOSTAJI *et al*., 2013). Desde então, várias

oxacilinases com atividade de hidrolizar carbapenêmicos foram relatadas. A enzima foi purificada a partir de um estirpe de *A. baumannii* multirresistente isolada em 1985 de um paciente em Edimburgo, Escócia (QUEENAN, BUSH, 2007). A primeira descrição de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos no Brasil foi em 2003, com oito isolados, relacionados a um surto, coletados de pacientes internados no Hospital das Clínicas e no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. Esses isolados eram produtores de OXA-23 e faziam parte de um mesmo clone, demonstrando a ocorrência da disseminação inter-hospitalar naquela cidade (DALLA-COSTA *et al.*, 2003).

O segundo relato foi descrito na literatura apenas em 2009, observando a disseminação de clones multirresistentes de *A. baumannii* produtores do gene codificador da enzima OXA-23 na cidade do Rio de Janeiro. Dois clones foram prevalentes, sendo um deles disseminados em sete hospitais e o outro em cinco hospitais (CARVALHO *et al.*, 2009). Neste mesmo ano, ocorreu o registro da transmissão e disseminação clonal de *A. baumannii* produtor desta enzima, entre profissionais de saúde, equipamentos médicos e pacientes em Porto Alegre (MARTINS *et al.*, 2009). Em 2010, Schimith-Bier e colaboradores avaliaram a persistência do primeiro clone de *A. baumannii* identificado na cidade de Curitiba. Neste estudo, foram avaliados isolados clínicos de *A. baumannii* onde foi detectada a presença de três clones distintos produtores da enzima OXA-23, sendo um deles genotipicamente semelhante ao primeiro clone identificado em 1999, que persistiu no mesmo hospital até abril de 2004.

Depois desses achados enzimas do grupo OXA já foram identificadas em vários estados brasileiros, como São Paulo (ANTONIO *et al*., 2008; ANTONIO *et al*., 2009), Rio de Janeiro (CARVALHO *et al*., 2009; CARVALHO *et al*., 2011), Rio Grande do Sul (MARTINS *et al*., 2009; MARTINS, BARTH, 2013), Espírito Santo, Alagoas, Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Norte, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul (CARVALHO *et al*., 2011). Contudo, não há relatos da ocorrência dessas enzimas no estado do Ceará, justificando a pesquisa da frequência dos genes *bla* $_{OXA}$ em isolados de *A. baumanni* no nosso estado (**Figura 2**).

Figura 2 - Distribuição do gene *bla* OXA em isolados de *A.baumannii* no Brasil



FONTE: Medeiros, Lincopan, 2013.

A. baumannii produtor da enzima OXA-23 tem-se disseminado rapidamente e surtos hospitalares relacionados a esse microrganismo têm sido observados em vários países do mundo (MUGNIER *et al*, 2010), como Tunísia, Emirados Árabes Unidos (MUGNIER *et al*., 2010), Bulgária (STOEVA *et al*., 2008), Afeganistão e Iraque (CALHOUN *et al*., 2008), Turquia (GUR *et al*., 2008), Tailândia (NIUMSUP *et al*., 2009), Itália (ANSALDI *et al*., 2011), França (GARLANTEZEC *et al*., 2011), Portugal (MANAGEIRO *et al*., 2012), Polônia (NOWAK *et al*., 2012) e Grécia (LIAKOPOULOS *et al*., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Detectar a frequência de *Acinetobacter baumannii* produtores de carbapenemases isolados de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar em hospitais de ensino no Ceará e identificar os genes responsáveis pela produção dessa enzima.

3.2 Objetivos Específicos:

- Verificar a frequência de isolados nosocomiais de *A. baumannii* na Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS), no Hospital Geral de Fortaleza (HGF), no Hospital Geral César Calls (HGCC) e no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC);
- Analisar o perfil de sensibilidade antimicrobiana de espécies de *A. baumannii* isolados de infecções nosocomiais na SCMS, no HGF, no HGCC e no HUWC;
- Investigar a presença dos genes $bla_{\text{OXA-23}}$, $bla_{\text{OXA-24}}$, $bla_{\text{OXA-51}}$ e $bla_{\text{OXA-58}}$ nos isolados nosocomiais de *A. baumannii* oriundos dos diferentes hospitais de ensino pesquisados;
- Relacionar o isolamento de *A. baumannii* dos hospitais de ensino supramencionados com a origem clínica, local de internação, perfil de resistência e frequência dos genes $bla_{\text{OXA-23}}$, $bla_{\text{OXA-24}}$, $bla_{\text{OXA-51}}$ e $bla_{\text{OXA-58}}$.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Respeitando os aspectos éticos, conforme resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, esta pesquisa foi aprovada pela Comissão Interna de Pesquisa dos hospitais de ensino (SCMS, HGF, HGCC e HUWC - **Anexo A, B, C e D**) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Universidade Estadual Vale do Acaraú (**Parecer** 1.843.504/2016 – **Anexo E**). Os sujeitos da pesquisa tiveram suas identidades preservadas e eles ou seus responsáveis assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) sobre sua participação neste trabalho de pesquisa (**APÊNDICE 1**).

4.2 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo primário, observacional e transversal, onde foram coletados dados epidemiológicos em relação à frequência e o perfil de sensibilidade antimicrobiana de *A. baumannii* provenientes de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar internados em quatro hospitais de ensino de Ceará (SCMS, HGF, HGCC e HUWC). Além disso, foi realizada pesquisa experimental *in vitro* para investigação da presença dos genes $bla_{\text{OXA-23}}$, $bla_{\text{OXA-24}}$, $bla_{\text{OXA-51}}$ e $bla_{\text{OXA-58}}$ nos espécimes de *A. baumannii* através de técnicas laboratoriais, como PCR convencional e eletroforese.

4.3 Coleta de dados

Durante o período de novembro de 2016 a abril de 2017 foram coletados espécimes nosocomiais de *A. baumannii* isolados de sangue, aspirado traqueal, ponta de cateter percutâneo, urina, secreção de abscesso e de ferida cirúrgica. Vale ressaltar, que o isolamento das espécies bacterianas foi realizado a partir de amostras clínicas de pacientes internados em enfermarias e Unidades de Terapia Intensiva com diagnóstico de infecção hospitalar, desde que essas amostras já tivessem sido previamente solicitadas e coletadas pela equipe médica dos hospitais de ensino envolvidos nesta pesquisa. Portanto, não foi feita coleta adicional de sangue e nem de nenhuma outra amostra clínica do paciente. Dessa forma, a quantidade e manipulação das amostras seguiram o protocolo operacional padrão de cada hospital, assim como o método de descarte das amostras biológicas seguiu o plano de gerenciamento de resíduos de serviço de saúde de acordo com a Resolução RDC Nº306 de 07 de dezembro de 2004.

Todos os isolados foram previamente identificados no laboratório de microbiologia dos hospitais analisados através do sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar o gene *bla* OXA-*51* foi posteriormente realizada para confirmação da identidade dos espécimes de *A. baumannii* (TURTON et al., 2006).

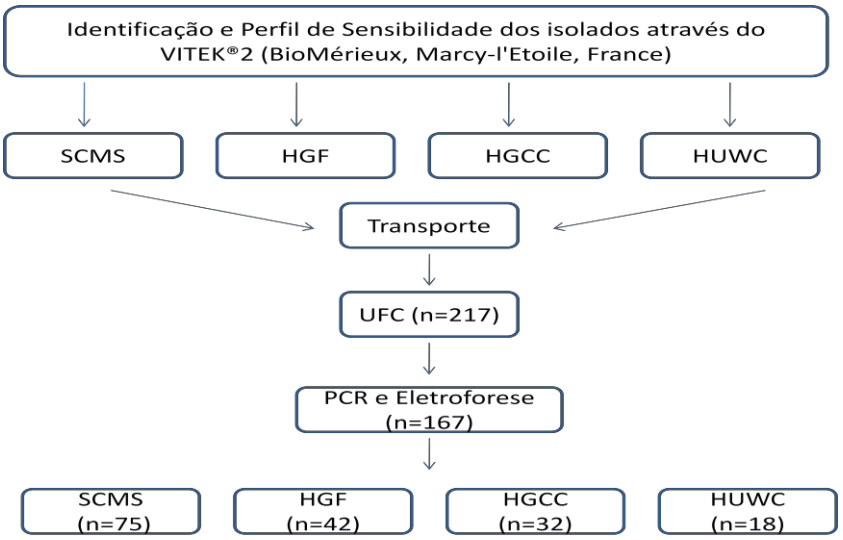
A análise da sensibilidade aos antimicrobianos: Penicilinas (ampicillina/sulbactam, piperacillina/tazobactam e ampicillina), cefalosporinas (ceftriaxona, cefoxitina, ceftazidima, cefuroxima, cefuroxima axetil e cefepima), quinolonas (ciprofloxacina), aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), carbapenêmicos (imipenem e meropenem), glicilciclinas (tigeciclina) e polipeptídeos (colistina) foi executada no laboratório de microbiologia dos hospitais de ensino investigados através do sistema automatizado VITEK®2 (*BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France*). A Multidroga resistência (MDR) foi definida como resistência a três ou mais classes dos fármacos testados (CASTILHO et al., 2017). Adicionalmente, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018), para os isolados resistentes à tigeciclina.

Após isolamento, identificação e análise do perfil de sensibilidade antimicrobiana realizados nos hospitais pesquisados, os espécimes foram armazenados e enviados em tubos contendo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Himedia ®, Mumbai, Índia) com glicerol a 20% ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LAMP) da Universidade Federal do Ceará (UFC) em Sobral, onde foram conservados em freezer a - 80ºC (Revco, EUA) para posterior processamento.

No caso dos espécimes que foram isolados dos hospitais de ensino em Fortaleza, esses foram acondicionados em tubos tipo eppendorff contendo BHI com glicerol a 20% em condições de temperatura adequada (2 a 8ºC) de forma a preservar a sua integridade e estabilidade, bem como a segurança do pessoal envolvido, durante o processo de transporte das espécies bacterianas para o laboratório de Microbiologia da UFC em Sobral. O transporte foi realizado pela mestranda, Izabelly Linhares Ponte Brito, obedecendo às normas de biossegurança, de forma a prevenir riscos de exposição direta dos profissionais envolvidos, dos transportadores, da população e do ambiente, de acordo com a RDC Nº 20 de 10 de abril de 2014.

As cepas foram consideradas oriundas de infecções nosocomiais quando isoladas de infecção adquirida após a admissão do paciente no hospital e cuja manifestação ocorreu durante a internação ou após a alta, podendo ser relacionada com a internação ou a procedimentos hospitalares (OMS, 2008).

4.4 Delineamento experimental



Fonte: O autor, 2018

Figura 3 – Esquema experimental

4.5 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios para inclusão na pesquisa foram:

- Culturas de pacientes com diagnóstico de infecção nosocomial que aceitaram participar do estudo, mediante TCLE (**APÊNDICE 1**) assinado pelo próprio ou seu responsável;
- Culturas provenientes dos Hospitais de Ensino SCMS, HGF, HGCC e HUWC positivas para *A. baumannii*;
- Isolados de *A. baumannii* processados adequadamente que mantinham a viabilidade apropriada para os estudos genéticos propostos, oriundos dos hospitais de ensino.

4.6 Reativação dos isolados

Todas as etapas laboratoriais desta pesquisa foram realizadas no Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS, em estação de trabalho com fluxo laminar, grau de segurança classe II, mediante desinfecção prévia.

A reativação dos espécimes armazenados em *freezer* a -80ºC foi realizada acrescentando-se uma alíquota de 50µl da cultura em glicerol em um tubo de ensaio contendo 5,0ml de caldo BHI (Himedia®, Mumbai, Índia) e mantido em estufa bacteriológica por 18 horas a 37ºC, um tubo para cada amostra e mais um tubo de controle negativo, após crescimento, o inoculo foi semeado em placa com Ágar MacConkey (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) utilizando-se uma alça bacteriológica estéril e colocada em estufa novamente a 37ºC, por 24h, juntamente com uma placa sem estriagem como controle negativo de contaminação dos meios ou da própria estufa. A seguir, utilizando-se de uma alça bacteriológica estéril foi transferida uma colônia isolada da placa de Ágar MacConkey para novos tubos de ensaio contendo 5,0 ml de BHI caldo, um tubo para cada amostra, mais um tubo de controle negativo, e colocados na estufa a 37ºC, durante 18 horas. Após crescimento, foi confirmada a pureza da amostra com a observação das características morfo-tintoriais através da coloração de Gram.

4.7 Detecção e identificação dos genes *bla* OXA

As 167 espécies nosocomiais de *A. baumannii* foram analisados para a detecção dos genes *bla* $_{OXA}$ por PCR. Os primers e protocolos previamente descritos por MA *et al*. (2015) foram usados para amplificar os genes *bla* $_{OXA\text{-}23}$, *bla* $_{OXA\text{-}24}$, *bla* $_{OXA\text{-}51}$ e *bla* $_{OXA\text{-}58}$. A sequência dos fragmentos que foram amplificados e o tamanho dos amplicons estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* para amplificação dos genes *bla* $_{OXA}$

Primer	Sequência de nucleotídeos (5'→3')	Amplificação (Pb)
Bla $_{OXA-23}$F	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	501 pb
Bla $_{OXA-23}$R	ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	
Bla $_{OXA-24}$F	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	246 pb
Bla $_{OXA-24}$R	AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	
Bla $_{OXA-51}$F	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353 pb
Bla $_{OXA-51}$R	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	
Bla $_{OXA-58}$F	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	
Bla $_{OXA-58}$R	CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599 pb

FONTE: MA *et al.*, 2015.

4.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25µL, contendo uma unidade formadora de colônia da espécie a ser identificada, 12,5µL de Taq Pol- Master Mix (2x) Green (Cellco Biotec, São Paulo, Brasil) que contém dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), KCL, $MgCl_2$, corante, tampão de carga para o gel e estabilizadores. Tendo sido acrescentado 8,5 µL de H_2O e 2,0 µL de cada *primer* e tampão de reação 1x (concentração final).

Os parâmetros de ciclagem para amplificar o fragmento correspondente à região codificadora do gene *bla* $_{OXA}$ incluíram os seguintes passos: uma desnaturação inicial (95ºC por 1 min); seguido por 30 ciclos de desnaturação (94ºC por 30 segundos e 53ºC por 30 segundos), anelamento (72 ºC por 45 segundos) e uma extensão final a 72ºC por 4 min.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,0% com tampão TBE 0,5X. A eletroforese foi realizada a 120 volts, por 40 minutos. A aplicação no gel de agarose foi feita com 8µl da reação, adicionados de 2µl de solução de azul de bromofenol. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos.

4.9 Análise Estatística

Os dados foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual. As prevalências dos genes OXA 23 e OXA 24 com as demais variáveis por meio dos testes exato de Fisher ou Qui-quadrado de Pearson. Após isso, para verificar quais destas variáveis foram independentemente das demais associadas à presença

desses genes, utilizou-se o modelo de Foward Stepwise no qual as variáveis com p<0,200 são selecionadas para regressão logística multinomial. Todas as análises foram realizadas no software Statistical Packcage for the Social Sciences adotando uma confiança de 95%.

5 RESULTADOS

Durante o período de estudo, foram analisados 167 isolados nosocomiais de *A. baumannii* coletados de pacientes internados nos quatro hospitais de ensino pesquisados. A distribuição dos isolados por unidade hospitalar, sítio de isolamento, setor de hospitalização, gênero e frequência dos genes *bla* $_{OXA-23}$, *bla* $_{OXA-24}$, *bla* $_{OXA-51}$ e *bla* $_{OXA-58}$ estão descritas na Tabela 2.

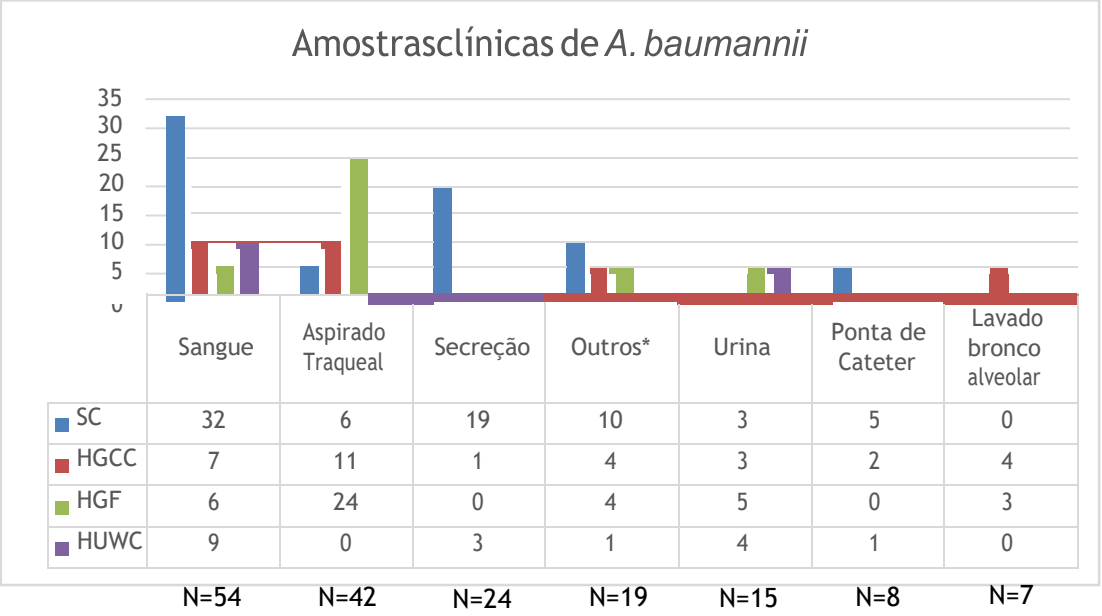
De todos os isolados analisados, observou-se que a circulação sanguínea foi o sítio de isolamento mais frequente, seguido de aspirado traqueal e secreção de ferida cirúrgica. Além disso, a maioria dos espécimes foi isolada das Unidades de Terapia Intensiva e enfermarias clínicas (Tabela 2, Gráficos 1 e 2).

Tabela 2 - Distribuição de isolados nosocomiais de *A. baumannii* por unidade hospitalar, sítio de isolamento, setor de hospitalização, gênero e frequência dos genes *bla* $_{OXA-23}$ e *bla* $_{OXA-24}$

	n	%
Microorganismo		
Acinetobacter baumannii	167	100,0
Unidade hospitalar		
SCMS	75	44,9
HGF	42	25,1
HGCC	32	19,2
HUWC	18	10,8
Sítio de isolamento		
Sangue	54	32,3
Aspirado traqueal	42	25,1
Secreção	24	14.4
Outros	47	28,1
Setor de hospitalização		
UTI	101	60,5
Outros	66	39,5
Gênero		
Feminino	67	40,1
Masculino	100	59,9
Genes		
bla $_{OXA-51}$	148	88,6
bla $_{OXA-23}$	78	46,7
bla $_{OXA-24}$	45	26,9

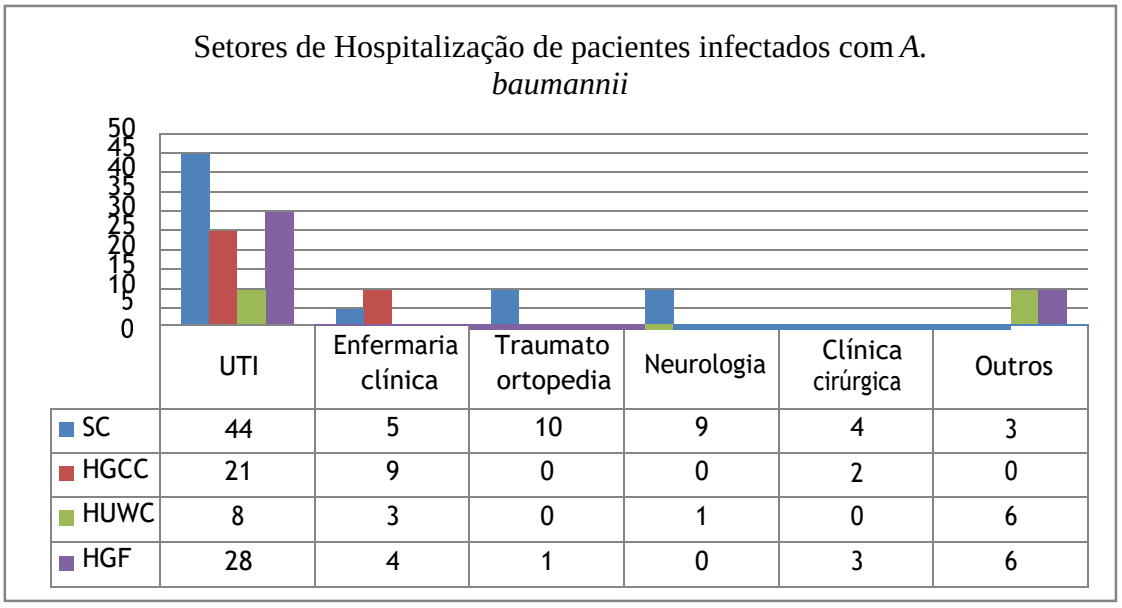
bla **OXA-58**	0	0
bla **OXA-23 e** ***bla*** **OXA-24**	4	2,39

Gráfico 1- Distribuição por sítio de isolamento de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* identificadas de novembro de 2016 a abril de 2017 em hospitais de ensino do Estado do Ceará.



* Relatórios gerados pelo sistema de idenificação automatizado Bacilios Gram-negativo GN, VITEK® (*BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France*).
* Outros: Swab umbilical, swab oral, Fístula de pé e Lavado Bronco-alveolar.

Gráfico 2 - Distribuição de isolados nosocomiais de *A.baumannii* identificados de novembro de 2016 a abril de 2017 de acordo com o setor de hospitalização em hospitais de ensino do Estado do Ceará.



* Relatórios gerados pelo sistema de idenificação automatizado Bacilios Gram-negativo GN, VITEK® (*BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France*).
* Outros: Emergência, Pós-transplante, Pediatria.

Os resultados demonstraram que 132 (79%) isolados nosocomiais de *A. baumannii* oriundos dos quatro hospitais de ensino investigados apresentaram resistência aos carbapenêmicos e diferentes padrões de resistência aos demais antimicrobianos testados. Por outro lado, a maioria foi sensível à colistina e à tigeciclina (Tabela 3). O perfil de resistência antimicrobiana de todos os isolados nosocomiais oriundos dos diferentes hospitais de ensino analisados está descritos nos gráficos 3, 4, 5 e 6.

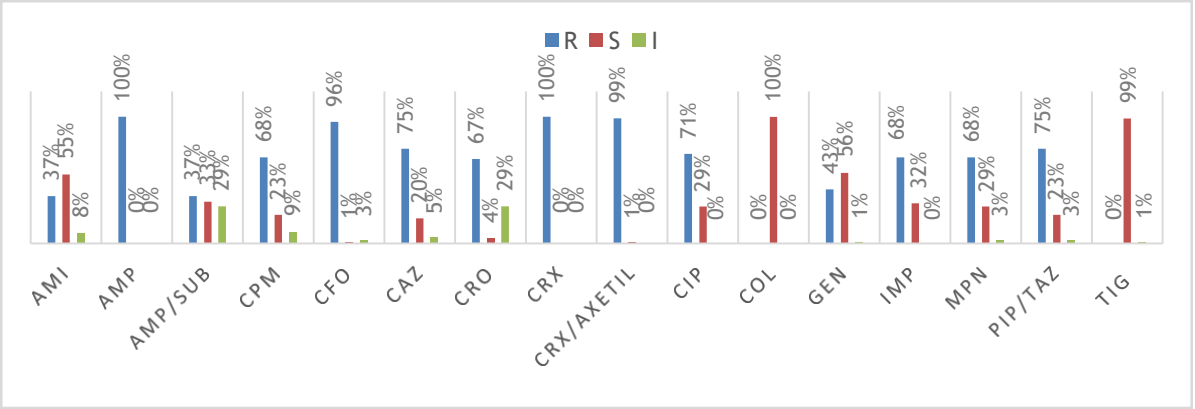
Tabela 3 - Perfis de resistência antimicrobiana dos isoaldos nosocomiais de *A. baumannii* dos quatro hospitais de ensino analisados

	Resistante		**Sensível**		**Intermediário**	
Antimicrobiano	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
Amicacina	59	42,4	68	48,9	12	8,6
Ampicillina	165	98,8	0	0,0	2	1,2
Ampicillina sulbactan	70	44,0	38	23.9	51	32,1
Cefepima	131	78,4	28	16,8	8	4,8
Cefoxitina	152	95,6	5	3,1	2	1,3
Ceftazidima	128	80.5	26	16,4	5	3,1
Ceftriaxona	128	76,6	6	3,6	33	19,8
Cefuroxima	166	99,4	0	0,0	1	0,6
Cefuroxima axetil	164	98,8	2	1,2	0	0,0
Ciprofloxacina	133	79,6	34	20,4	0	0,0
Colistina	0	0,0	159	100,0	0	0,0
Gentamicina	68	40,7	84	50,3	15	9,0
Imipenem	132	79,0	35	21,0	0	0,0
Meropenem	132	79,0	33	19,8	2	1,2
Piperacillina / tazobactam	137	82,0	28	16,8	2	1,2
Tigeciclina	4	2,5	146	91,8	9	5,7

Dados expressos em frequência e porcentagens absolutas.

* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado Bacillus Gram-negativo GN, VITEK® 2 (*BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France*).

Gráfico 3 - Sensibilidade a antimicrobianos de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de novembro de 2016 a abril de 2017 na SCMS

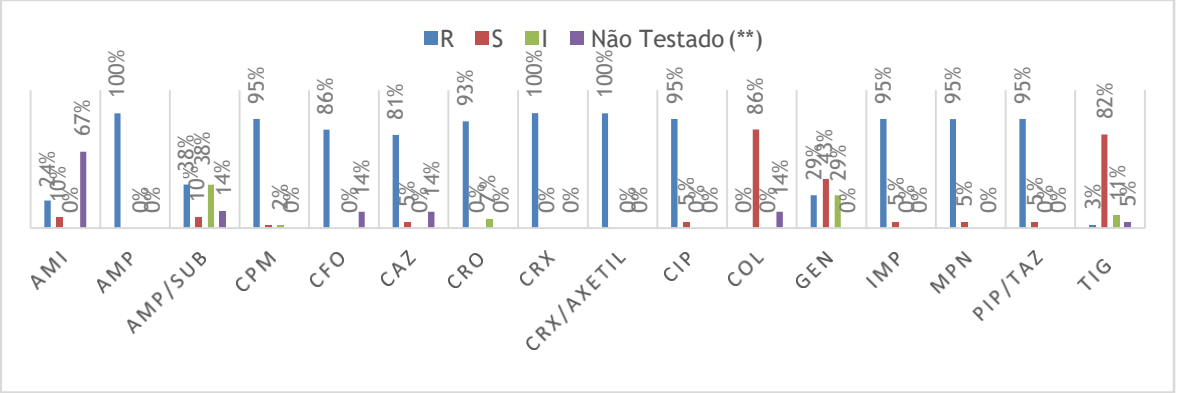


R: Resistente; S: Sensível; I: Intermediário.

* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado Bacillus Gram-negativo GN, VITEK® 2 (*BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France*).

AMI (Amicacina), AMP (Ampicilina), AMP/SUB (Ampicilina/ sulbactan), CPM (Cefepima), CFO (Cefoxitina), CAZ (Ceftazidima), CRO (Ceftriaxona), CRX (Cefuroxima), CRX/AXETIL (Cefuroxima/axetil), CIP (Ciprofloxacina), COL (Colistina), GEN (Gentamicina), IMP (Imipenem), MPN (Meropenem), PIP/TAZ (Piperacilina/Tazobactam), TIG (Tigeciclina).

Gráfico 4 - Sensibilidade a antimicrobianos de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de novembro de 2016 a abril de 2017 no HGF

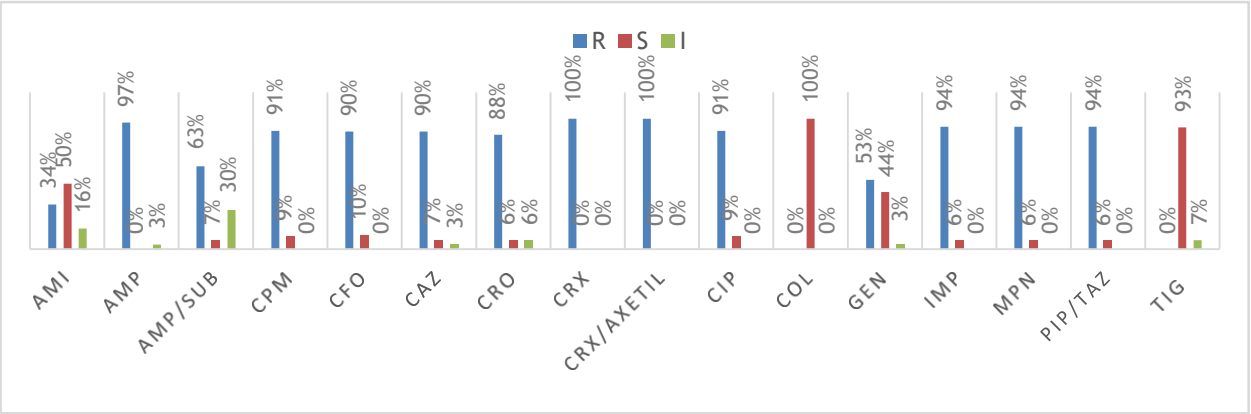


R: Resistente; S: Sensível; I: Intermediário

* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado Bacillus Gram-negativo GN, VITEK® 2 (*BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France*).

AMI (Amicacina), AMP (Ampicilina), AMP/SUB (Ampicilina/ sulbactan), CPM (Cefepima), CFO (Cefoxitina), CAZ (Ceftazidima), CRO (Ceftriaxona), CRX (Cefuroxima), CRX/AXETIL (Cefuroxima/axetil), CIP (Ciprofloxacina), COL (Colistina), GEN (Gentamicina), IMP (Imipenem), MPN (Meropenem), PIP/TAZ (Piperacilina/Tazobactam), TIG (Tigeciclina).

Gráfico 5- Sensibilidade a antimicrobianos de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de novembro de 2016 a abril de 2017 no HGCC

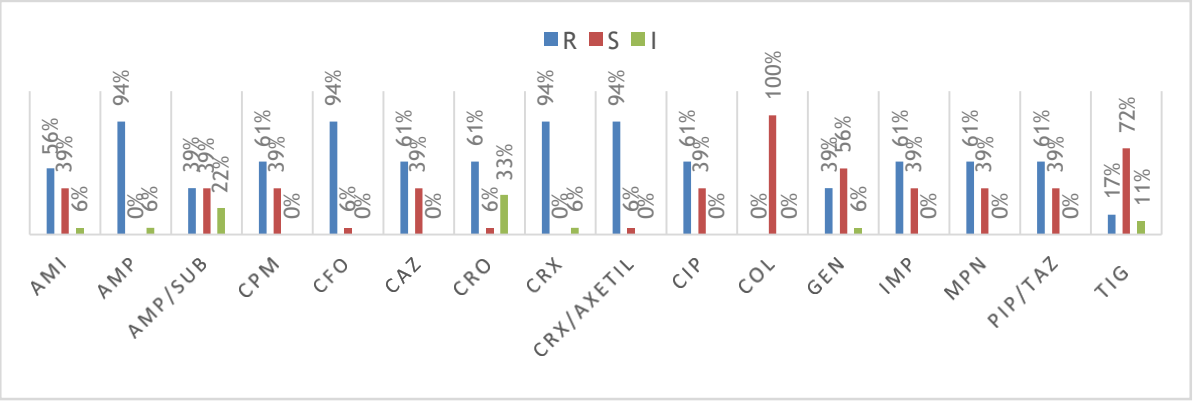


R: Resistente; S: Sensível; I: Intermediário

* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado Bacillus Gram-negativo GN, VITEK® 2 (*BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France*).

AMI (Amicacina), AMP (Ampicilina), AMP/SUB (Ampicilina/ sulbactan), CPM (Cefepima), CFO (Cefoxitina), CAZ (Ceftazidima), CRO (Ceftriaxona), CRX (Cefuroxima), CRX/AXETIL (Cefuroxima/axetil), CIP (Ciprofloxacina), COL (Colistina), GEN (Gentamicina), IMP (Imipenem), MPN (Meropenem), PIP/TAZ (Piperacilina/Tazobactam), TIG (Tigeciclina).

Gráfico 6 - Sensibilidade a antimicrobianos de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de novembro de 2016 a abril de 2017 no HUWC



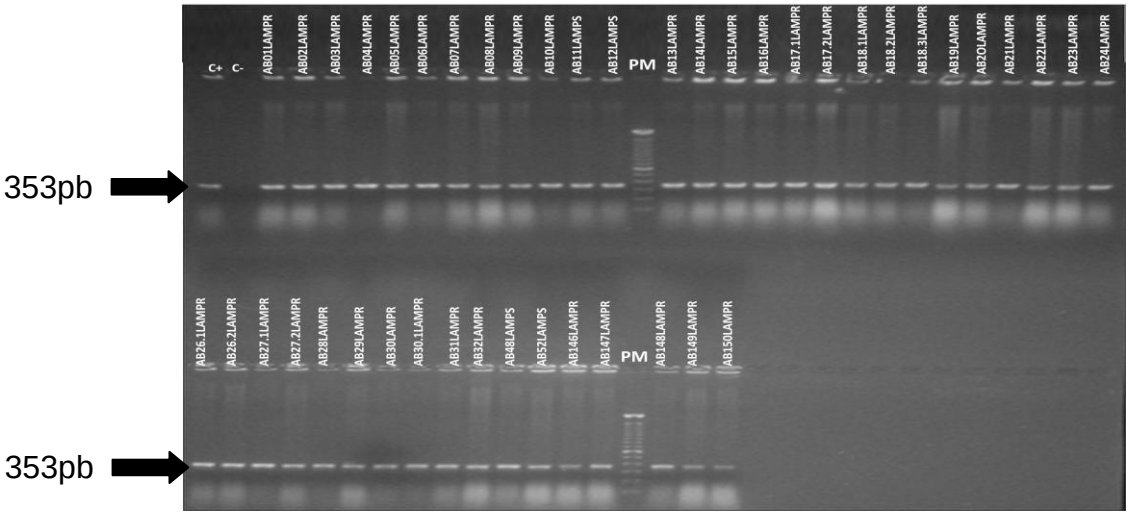
R: Resistente; S: Sensível; I: Intermediário

* Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado Bacillus Gram-negativo GN, VITEK® 2 (*BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France*).

AMI (Amicacina), AMP (Ampicilina), AMP/SUB (Ampicilina/ sulbactan), CPM (Cefepima), CFO (Cefoxitina), CAZ (Ceftazidima), CRO (Ceftriaxona), CRX (Cefuroxima), CRX/AXETIL (Cefuroxima/axetil), CIP (Ciprofloxacina), COL (Colistina), GEN (Gentamicina), IMP (Imipenem), MPN (Meropenem), PIP/TAZ (Piperacilina/Tazobactam), TIG (Tigeciclina).

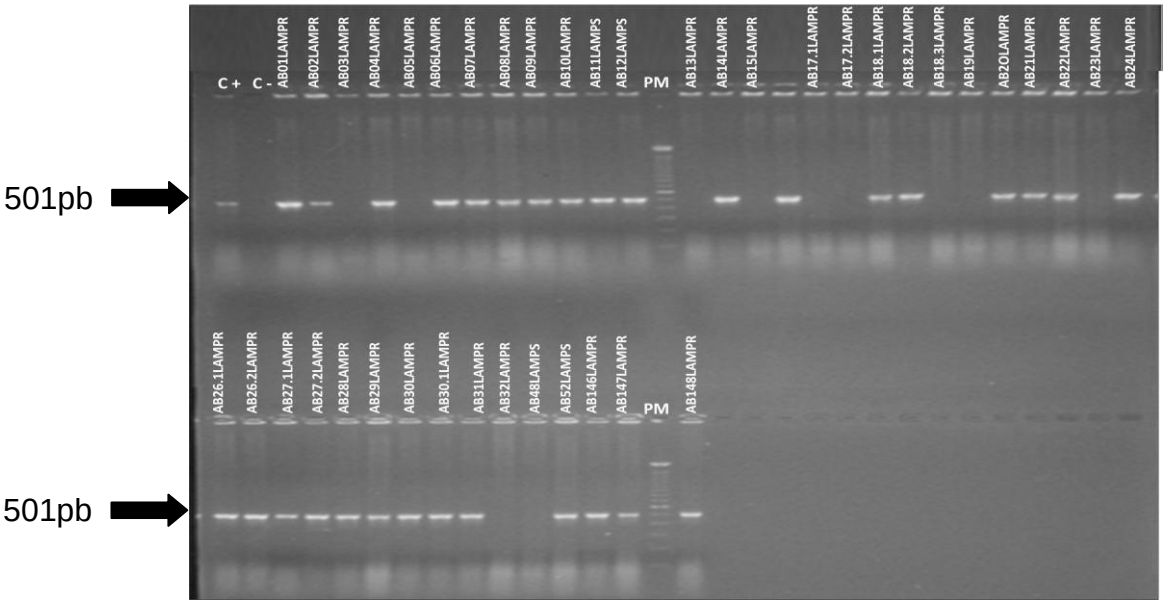
A amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes *bla* $_{\text{OXA-51}}$, *bla* $_{\text{OXA-23}}$, *bla* $_{\text{OXA-24}}$ e *bla* $_{\text{OXA-58}}$ de isolados nosocomiais de *A.baumannii* dos diferentes hospitais de ensino pesquisados está demonstrada nas figuras 3, 4, 5 e 6.

Figura 3- Gel de agarose contendo fragmentos de gene *bla* $_{OXA-51}$ de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de hospitais de ensino do Ceará amplificados por PCR - PM 100 pb (Invitrogen, EUA)



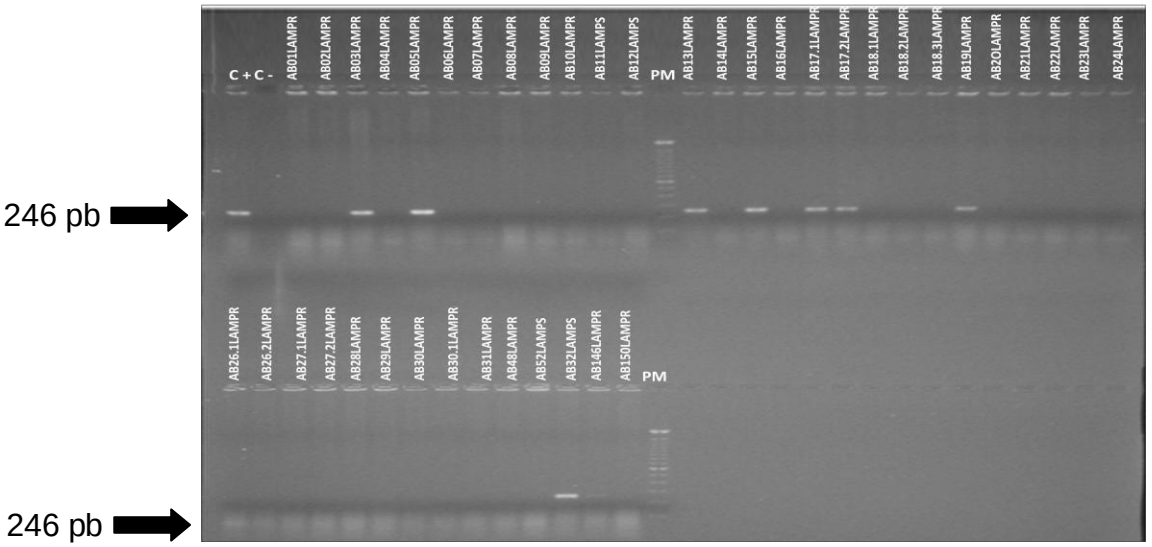
A seta indica fragmentos de 353 pb correspondentes à região de codificação do gene *bla* $_{OXA-51}$. PM - marcador de peso molecular (1kb).

Figura 4: Gel de agarose contendo fragmentos de gene *bla* $_{OXA-23}$ de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de hospitais de ensino do Ceará amplificados por PCR - PM 100 pb (Invitrogen, EUA)



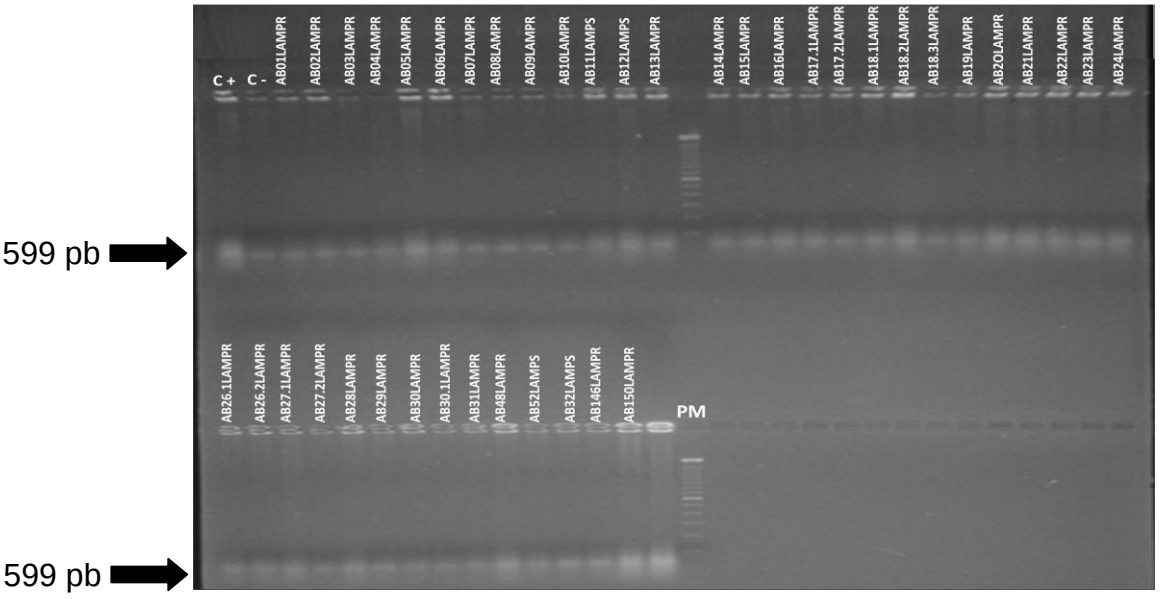
A seta indica fragmentos de 501 pb correspondentes à região de codificação do gene *bla* $_{OXA-23}$. PM - marcador de peso molecular (1kb) ; C +: controle positivo; C-: controle negativo.

Figura 5- Gel de agarose contendo fragmentos de gene *bla* $_{OXA-24}$ de espécimes nosocomiais de *A.baumannii* isolados de hospitais de ensino do Ceará amplificados por PCR - PM 100 pb (Invitrogen, EUA).



A seta indica fragmentos de 246 pb correspondentes à região de codificação do gene *bla* $_{OXA-24}$. PM - marcador de peso molecular (1kb) ; C +: controle positivo; C-: controle negativo.

Figura 6- Gel de agarose contendo fragmentos de gene *bla* $_{OXA-58}$ de espécimes de *A.baumannii* isolados de hospitais de ensino do Ceará amplificadas por PCR - PM 100 pb (Invitrogen, EUA).



A seta indica fragmentos de 599 pb correspondentes à região de codificação do gene *bla* $_{OXA-58}$. PM - marcador de peso molecular (1kb) ; C +: controle positivo; C-: controle negativo.

Dos 167 isolados analisados, 142 (85%) são multidroga resistentes (MDR). Destes, 73 (43,7%) abergavam o gene *bla* $_{OXA-23}$ e 42 (25,1%) continham o gene *bla* $_{OXA-24}$. A presença concomitante dos genes *bla* $_{OXA-23}$ e *bla* $_{OXA-24}$ foi significantemente associada ($p < 0,05$) com o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos, cefepima, ceftazidima, gentamicina e piperacilina / tazobactam (Tabela 4).

Por outro lado, apenas a presença do gene *bla* $_{OXA-23}$ em cepas com o fenótipo de resistência à amicacina foi estatisticamente significante ($p = 0,03$). Além disso, a associação do gene *bla* $_{OXA-24}$ foi estatisticamente significante com a presença do fenótipo de resistência à ceftriaxona e à ciprofloxacina ($p < 0,05$), e não foi encontrada associação estatisticamente significante entre a presença dos genes *bla* $_{OXA-23}$ e *bla* $_{OXA-24}$ e o perfil de resistência das cepas nosococomiais de *A. baumannii* aos outros antimicrobianos testados (Tabela 4).

Tabela 4 - Perfis de resistência antimicrobiana e frequência dos genes *bla* $_{OXA-23}$ e *bla* $_{OXA-24}$ dos isoaldos nosocomiais de *A. baumannii* dos quatro hospitais de ensino analisados

	***bla* OXA-23**			***bla* OXA-24**		
	Ausente	**Presente**	**p-Valor**	**Ausente**	**Presente**	**p-Valor**
Carbapenêmicos						
Resistente	60	72*	***<0,001***	89	43*	***<0,001***
	67,4%	92,3%		73,0%	95,6%	
Sensível	29*	6		33*	2	
	32,6%	7,7%		27,0%	4,4%	
Intermediário	0	0		0	0	
	0,0%	0,0%		0,0%	0,0%	
Amicacina						
Resistente	23	36*	***0,037***	46	13	0,861
	32,4%	52,9%		41,8%	44,8%	
Sensível	42*	26		55	13	
	59,2%	38,2%		50,0%	44,8%	
Intermediário	6	6		9	3	
	8,5%	8,8%		8,2%	10,3%	
Ampicilina						
Resistente	89	76	0,217	121	44	0,460
	100,0%	97,4%		99,2%	97,8%	
Sensível	0	0		0	0	
	,0%	,0%		,0%	,0%	
Intermediário	0	2		1	1	

	,0%	2,6%		,8%	2,2%	
Ampicilina sulbactan						
Resistente	27	43*	***0,001***	57	13	***0,001***
	32,1%	57,3%		47,9%	32,5%	
Sensível	29*	9		33*	5	
	34,5%	12,0%		27,7%	12,5%	
Intermediário	28	23		29	22*	
	33,3%	30,7%		24,4%	55,0%	
Cefepima						
Resistente	65	66*	***0,005***	89	42*	***0,015***
	73,0%	84,6%		73,0%	93,3%	
Sensível	22*	6		25*	3	
	24,7%	7,7%		20,5%	6,7%	
Intermediário	2	6		8	0	
	2,2%	7,7%		6,6%	,0%	
Cefoxitina						
Resistente	81	71	0,840	113	39	0,683
	96,4%	94,7%		95,0%	97,5%	
Sensível	2	3		4	1	
	2,4%	4,0%		3,4%	2,5%	
Intermediário	1	1		2	0	
	1,2%	1,3%		1,7%	,0%	
Caftazidma						
Resistente	60	68*	***0,009***	90	38*	***0,026***
	71,4%	90,7%		75,6%	95,0%	
Sensível	20*	6		24*	2	
	23,8%	8,0%		20,2%	5,0%	
Intermediário	4	1		5	0	
	4,8%	1,3%		4,2%	,0%	
Ceftriaxona						
Resistente	65	63	0,481	87	41*	***0,010***
	73,0%	80,8%		71,3%	91,1%	
Sensível	4	2		4	2	
	4,5%	2,6%		3,3%	4,4%	
Intermediário	20	13		31*	2	
	22,5%	16,7%		25,4%	4,4%	
Cefuroxima						
Resistente	89	77	0,284	122	44	0,269
	100,0%	98,7%		100,0%	97,8%	
Sensível	0	0		0	0	
	,0%	,0%		,0%	,0%	
Intermediário	0	1		0	1	
	,0%	1,3%		,0%	2,2%	
Cefuroxima axetil						
Resistente	88	76	1,000	120	44	1,000
	98,9%	98,7%		99,2%	97,8%	
Sensível	1	1		1	1	

	1,1%	1,3%		,8%	2,2%	
Intermediário	0	0		0	0	
	,0%	,0%		,0%	,0%	
Ciprofloxacina						
Resistente	66	67	0,060	91	42*	***0,008***
	74,2%	85,9%		74,6%	93,3%	
Sensível	23	11		31*	3	
	25,8%	14,1%		25,4%	6,7%	
Intermediário	0	0		0	0	
	,0%	,0%		,0%	,0%	
Colistina						
Resistente	0	0	1,000	0	0	1,000
	,0%	,0%		,0%	,0%	
Sensível	84	75		119	40	
	100,0%	100,0%		100,0%	100,0%	
Intermediário	0	0		0	0	
	,0%	,0%		,0%	,0%	
Gentamicina						
Resistente	29	39*	***0,007***	53	15	***<0,001***
	32,6%	50,0%		43,4%	33,3%	
Sensível	47*	37		65*	19	
	52,8%	47,4%		53,3%	42,2%	
Intermediário	13*	2		4	11*	
	14,6%	2,6%		3,3%	24,4%	
Imipenem						
Resistente	60	72	***<0,001***	89	43	***0,001***
	67,4%	92,3%		73,0%	95,6%	
Sensível	29	6		33	2	
	32,6%	7,7%		27,0%	4,4%	
Intermediário	0	0		0	0	
	,0%	,0%		,0%	,0%	
Meropenem						
Resistente	60	72*	***<0,001***	89	43*	***0,006***
	67,4%	92,3%		73,0%	95,6%	
Sensível	27*	6		31*	2	
	30,3%	7,7%		25,4%	4,4%	
Intermediário	2	0		2	0	
	2,2%	,0%		1,6%	,0%	
Piperalicina tazobactam						
Resistente	65	72*	***0,004***	94	43*	***0,021***
	73,0%	92,3%		77,0%	95,6%	
Sensível	22*	6		26*	2	
	24,7%	7,7%		21,3%	4,4%	
Intermediário	2	0		2	0	
	2,2%	,0%		1,6%	,0%	
Tigecilina						
Resistente	4	0	***0,043***	4	0	0,208

	4,8%	,0%	3,4%	,0%
Sensível	73	73*	110	36
	86,9%	97,3%	92,4%	90,0%
Intermediário	7*	2	5	4
	8,3%	2,7%	4,2%	10,0%

*p<0,05, teste exato de Fisher ou Qui-quadrado de Pearson. Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

A frequência de detecção dos genes *bla* $_{OXA-23}$, *bla* $_{OXA-24}$, *bla* $_{OXA-51}$ e *bla* $_{OXA-58}$ em relação ao perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos nos quatro hospitais de ensino investigados está descrita na Tabela 5.

Tabela 5 - Frequência de detecção dos genes *bla* $_{OXA-23}$, *bla* $_{OXA-24}$, *bla* $_{OXA-51}$ e *bla* $_{OXA-58}$ em relação ao perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos na SCMS, HGF, HGCC e HUWC

HOSPITAL	**GENES DE RESISTÊNCIA**				
	bla $_{\mathbf{OXA-51}}$	***bla*** $_{\mathbf{OXA-23}}$	***bla*** $_{\mathbf{OXA-24}}$	***bla*** $_{\mathbf{OXA-58}}$	***bla*** $_{\mathbf{OXA-23}}$ / ***bla*** $_{\mathbf{OXA-24}}$
SCMS (n=75)					
R (n=51)	51 (100,0%)	40 (78,4%)	8 (15,6%)	0	0
S (n= 24)	0	1(4,16%)	1 (4,16%)	0	0
HGF (n=42)					
R (n=40)	38 (95,0%)	15 (37,5%)	21 (52,5%)	0	3 (7,5%)
S (n= 2)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0	0	0
HGCC (n=32)					
R (n=30)	29 (96,6%)	13 (43,3%)	14 (46,6%)	0	0
S (n= 2)	0	1 (50,0%)	0	0	0
HUWC (n=18)					
R (n=11)	11 (100,0%)	7 (63,6%)	0	0	0
S (n= 7)	5 (71,4%)	0	1 (14,2%)	0	1 (14,2%)

*R: Cepas resistentes aos carbapenêmicos; S: Cepas sensíveis aos carbapenêmicos.

O gene *bla* $_{OXA-23}$ foi encontrado em 34,6% dos isolados nosocomiais de *A. baumanni* da corrente sanguínea. Por outro lado, a ocorrência do gene *bla* $_{OXA-24}$ foi significantemente associada (p = 0,004) aos isolados de *A. baumanni* do aspirado traqueal, tendo sido encontrado em 19 (42,2%) espécimes. Além disso, a frequência do

gene *bla* $_{OXA-24}$ foi estatísticamente significante em *A. baumannii* isolados do HGCC e HGF (p <0,001). Contudo, não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a presença dos genes *bla* $_{OXA-23}$ e *bla* $_{OXA-24}$ com setor de hospitalização e gênero de pacientes hospitalizados (Tabela 6).

Tabela 6- Frequência dos genes *bla* $_{OXA-23}$ e *bla* $_{OXA-24}$ por unidade hospitalar, sítio de isolamento, setor de hospitalização e gênero

	***bla* OXA-23**			***bla* OXA-24**		
	Ausência	**Presença**	**p-Valor**	**Ausência**	**Presença**	**p-Valor**
Unidade Hospitalar						
SCMS	34	41	0.294	66*	9	***<0.001***
	38.2%	52.6%		54.1%	20.0%	
HGCC	18	14		18	14*	
	20.2%	17.9%		14.8%	31.1%	
HGF	26	16		21	21*	
	29.2%	20.5%		17.2%	46.7%	
HUWC	11	7		17	1	
	12.4%	9.0%		13,9%	2,2%	
Sítio de isolamento						
	24	18	0.469	23	19*	***0.004***
Aspirado Traqueal	27.0%	23.1%		18.9%	42.2%	
Sangue	27	27		47*	7	
	30,3%	34,6%		38.5%	15.6%	
Secreção	10	14		19	5	
	11.2%	17.9%		15.6%	11.1%	
Outros	28	19		33	14	
	31.5%	24.4%		27.0%	31.1%	
Setor de hospitalização						
UTI	55	46	0.710	75	26	0.655
	61.8%	59.0%		61.5%	57.8%	
Outros	34	32		47	19	
	38.2%	41.0%		38.5%	42.2%	
Gênero						
Feminino	34	33	0,589	49	18	0,985
	38.2%	42.3%		40.2%	40.0%	
Masculino	55	45		73	27	
	61.8%	57.7%		59.8%	60.0%	

*p<0,05, Teste exato de Fisher ou teste Qui-quadrado de Pearson. Dados expressos em frequência e porcentagem absolutas.

6. DISCUSSÃO

As infecções por *A. baumannii* e o desenvolvimento da resistência são problemas bem conhecidos que estão se tornando cada vez mais frequentes e que devem ser adequadamente abordados em todo o mundo[5]. Os resultados desta pesquisa mostraram que os isolados de *A. baumannii* foram mais frequentes nas amostras de sangue (32,3%) e de aspirado traqueal (25,1%), corroborando os dados encontrados em outros hospitais brasileiros[14,5,15,4].

A maioria das cepas de *A. Baumannii* nosocomiais foram isolados de pacientes do gênero masculino (59,9%), corroborando com resultados obtidos por Chang *et al*., (2015)[16] (59,7%) e Castilho *et al (*2017)[5] (59,4%).

Assim como nos estudos realizados por Kooti *et al*. (2015)[6], Raro *et al*. (2017)[2], Li *et al*. (2017)[17] e CASTILHO *et al*., (2017)[5], em todos os hospitais pesquisados neste estudo a UTI foi a unidade de internação com o maior número de isolados nosocomiais de *A. baumannii*, este é um dado preocupante uma vez que a UTI pode servir como reservatório para esses patógenos oportunistas e frequentemente os pacientes internados nesta unidade já se encontram debilitados, fazendo uso de dispositivos invasivos e antimicrobianos de largo espectro, além de poderem ter algum grau de imunossupressão. Lowings *et al*. (2015)[18] ressaltaram que a alta incidência de cepas de microrganismos multiresistentes em UTI pode ser devido ao uso excessivo de antimicrobianos.

Nesta pesquisa, 85% das cepas nosocomiais de *A. baumannii* foram MDR e as taxas de resistência ao imipenem e ao meropenem atingiram 79%. Nos últimos anos, *A. baumannii* tem sido comumente relatado como resistente a múltiplas drogas, e as taxas de resistência a imipenem, meropenem, ceftazidima, piperacillina/tazobactam, ciprofloxacina e gentamicina na América Latina parecem estar entre as maiores do mundo[19]. Essa taxa de resistência aos carbapenêmicos é maior do que a reportada em outros países, como China, Arábia Saudita, Grécia, Itália e EUA, onde as taxas foram 29,4%, 69%, 57,4%, 45,7% e 34%, respectivamente[20,21,22,23,24].

Estudos anteriores realizados no Brasil demonstraram crescimento nas taxas de resistência de cepas de *A. baumannii* a muitos agentes antimicrobianos importantes, especialmente imipenem e meropenem[25,26,15]. Também tem sido reportado aumento nas taxas de *A. baumannii* multirresistente em países como Qatar[7], Espanha[27], China[28], Indonésia[29], Marrocos[30], Irã[31] e Líbano[19].

Os isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos nos hospitais pesquisados neste estudo também demonstraram altas taxas de co-resistência a diversas classes de agentes antimicrobianos, exceto tigeciclina e colistina. Todos os isolados foram sensíveis à colistina, semelhante aos dados encontrados na Argélia e no Irã[31], embora tenha sido relatada diminuição de sensibilidade à colistina na Arábia Saudita (70,9%), Kuwait (92,5%) e Egito (95%)[32]. Contudo, tigeciclina e colistina continuam sendo as opções terapêuticas de escolha para o tratamento de infecções por bactérias produtoras de carbapenemases[33,5,27,2].

Os isolados clínicos de *A. baumannii* MDR analisados nesta pesquisa constituem um problema terapêutico de grande preocupação, uma vez que podem inferir num prognóstico desfavorável quando do tratamento de infecções graves causadas por esses patógenos. Esses achados reforçam a idéia de uma tendência crescente de resistência dessa bactéria a carbapenêmicos, o que pode implicar na disseminação de linhagem altamente resistente[34,35], particularmente quando a resistência é mediada por elementos móveis que podem ser prontamente transferidos e disseminados entre isolados[2].

O gene *bla* $_{\text{OXA-51}}$ foi prevalente entre os isolados nosocomiais de *A. baumannii* neste estudo, como relatado por outros autores em todo o mundo[16,31,6,5,27,28,29,30,31,19],confirmando estudos que sugerem a presença desse gene como intrínseco à espécie[8], uma vez que o mesmo está localizado no cromossomo. Apesar desse gene não estar restrito à espécie de *A. baumannii,* o mesmo está presente na grande maioria das cepas da espécie[6]. Por outro lado, a alta prevalência de *bla* $_{\text{OXA-23}}$ nos isolados analisados pode ser devido à sua transferência horizontal, já que esse gene frequentemente tem origem plasmidial, em transposons e sequências de inserção[36].

Por outro lado, não foi detectada neste estudo a ocorrência do gene *bla* $_{\text{OXA-58}}$, mas cepas de *A. baumanni* OXA-58 também têm sido pouco frequentes em outras regiões do Brasil[37].

A resistência a carbapenêmicos em *A. baumannii* resulta frequentemente da produção de oxacilinases adquiridas, como OXA-23, OXA-24 e OXA-58, além dos OXA-143 e OXA-72 menos frequentes. A produção da carbapenemase OXA-23 tem sido frequentemente identificada em cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos isoladas de pacientes hospitalizados[14,6,13,7,5,17,2]. Estas infecções estão

associadas a alta morbidade e mortalidade e contribuem para uma internação prolongada e altos custos hospitalares[1]. Surtos de isolados que abrigam genes que codificam grupos de carbapenemase de tipo OXA (*bla* $_{OXA-23}$, *bla* $_{OXA-24}$, *bla* $_{OXA-51}$ e *bla* $_{OXA-58}$) são cada vez mais frequentes em todo o mundo[16].

Como dito anteriormente, o gene responsável pela produção da carbapenemase OXA-23 e OXA-24 foi encontrado em 46,7% e 26,9% dos isolados neste estudo, respectivamente, frequência similar aos resultados descritos por outros pesquisadores[16,6,7,15,5,36,30]. Além disso, a coocorrência de dois genes de tipo OXA também foi relatada em *A. baumannii*[5]. No presente estudo, a coexistência de *bla* $_{OXA-23}$ e *bla* $_{OXA-24}$ ocorreu em quatro isolados.

Todavia, 6,8% dos isolados nosocomiais de *A.baumannii* resistentes aos carbapenêmicos analisados neste estudo, não apresentaram os genes *bla*$_{OXA-23}$ e *bla*$_{OXA-24}$, responsáveis pelos mecanismos enzimáticos adquiridos. Neste caso, a resistência ao imipenem e ao meropenem podem ser explicados pela presença do elemento *ISAba1* a montante do gene *bla* $_{OXA-51}$. Portanto, a presença da sequência de inserção IS*Aba1* ou IS*Aba9* pode ser necessária para aumentar a expressão associada a outros mecanismos, como a permeabilidade reduzida da membrana externa ou a expressão excessiva de bombas de efluxo[38,39].

A propagação de cepas hospitalares de *A. baumannii* multiresistente produtoras de OXA no Brasil é um grave problema de saúde pública. O surgimento dessas cepas está associado a altas taxas de resistência aos antimicrobianos comumente usados na prática clínica, dificultando cada vez mais o tratamento de infecções nosocomiais. A identificação do fenótipo e do genótipo de OXA é de extrema importância para um manejo adequado do paciente, evitando o surgimento e disseminação de surtos, além de estabelecer uma abordagem terapêutica diferencial que preferencialmente inclui o uso combinado de agentes antibacterianos.

Nesta pesquisa a ocorrência do gene *bla*$_{OXA-24}$ foi fortemente associada às amostras isoladas de aspirado traqueal. Pneumonia associada à ventilação mecânica é uma das infecções nosocomiais mais frequentes causadas por esse microrganismo[40].

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, esses dados indicam uma elevada frequência de isolados nosocomiais de A. *baumannii* MDR nos hospitais analisados, sendo a maioria resistente aos carbapenêmicos e sensível à colistina e tigeciclina. O mecanismo de resistência mais frequentemente observado foi a produção de carbapenemases, notadamente OXA-23. Portanto, esses dados poderão contribuir substancialmente com a vigilância epidemiológica, que está relacionada aos princípios básicos de que o monitoramento deve ser a base para a implantação de medidas para combater infecções hospitalares, e poderá também auxiliar na implementação de protocolos terapêuticos, melhorando a qualidade da assistência prestada aos pacientes hospitalizados.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Microbiology, Immunology and Infection

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: High Frequency of OXA-Type Carbapenemases Among Acinetobacter baumannii Strains in Teaching Hospitals of Ceará, Brazil

Article Type: Original Article

Keywords: Acinetobacter baumannii; beta-lactamases; carbapenems; cross infection; antimicrobial drug resistance.

Corresponding Author: Mrs. Izabelly Ponte, Corresponding

Author's Institution:

First Author: Francisco Cesar Barroso Barbosa, PhD, MSc

Order of Authors: Francisco Cesar Barroso Barbosa, PhD, MSc; Izabelly Ponte; Ana Jéssyka Alves Morais, MSc; Ana Kélvia Araújo, MSc; Paulo Goberlânio de Barros Silva, PhD, MSc; Vicente de Paulo Teixeira Pinto, PhD, MSc

Abstract: Background/Purpose(s): Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen resistant to several antimicrobials. We aimed to investigate the sensitivity profile and frequency of OXA-type carbapenemases among A. baumannii nosocomial strains isolated from patients in teaching hospitals of Ceará, Brazil.

Methods: From November 2016-April 2017, A. baumannii nosocomial strains from four teaching hospitals were analyzed. All isolates were identified, and the antimicrobial susceptibility profile established by VITEK®2.

Polymerase chain reaction (PCR) to amplify the bla OXA-51 gene was performed on all presumptively strains identified as A. baumannii, and minimum inhibitory concentrations were determined by the broth microdilution for tigecycline- resistant isolates. Furthermore, bla OXA- 23, bla OXA-24, and bla OXA-58 genes were detected by PCR.

Results: A total of 167 A. baumannii nosocomial strains were analyzed, from which 101 (60.5%) were from patients in intensive care units, 54 (32.3%) were isolated from the bloodstream, and 142 (85.0%) were multi-drug resistant (MDR). 132 (79.0%) isolates were resistant to carbapenems, but all isolates were susceptible to colistin and most of them were susceptible to tigecycline. The majority harbored the bla OXA-23 gene, these data were significantly associated with an MDR phenotype. In addition, 45 (26.9%) contained bla OXA-24, four strains harbored concomitantly bla OXA-23 and bla OXA-24 and no bla OXA-58 gene was detected.

Conclusion: These results demonstrated high resistance rates to the different antimicrobial drugs analyzed and a high frequency of bla OXA-23 gene, suggesting that colistin and tigecycline could be the therapeutic options for the treatment of infections associated with MDR A. baumannii.

Manuscript

High Frequency of OXA-Type Carbapenemases Among *Acinetobacter baumannii* Strains in Teaching Hospitals of Ceará, Brazil

Short Title: "OXA-Type Carbapenemases in Teaching Hospitals in Brazil"

Francisco Cesar Barroso Barbosa[1*], Izabelly Linhares Ponte Brito[1], Ana Jéssyka Alves Morais[2], Ana Kélvia Araújo Arcanjo[1], Paulo Goberlânio de Barros Silva[1], Vicente de Paulo Teixeira Pinto[1,2]

[1]Health Sciences Graduate Program, Federal University of Ceará, Comandante Mauricélio Rocha Pontes Street, 100, Sobral, CE, CEP 62.042-280 Brazil

[2]Biotechnology Graduate Program, Federal University of Ceará, Comandante Mauricélio Rocha Pontes Street, 100, Sobral, CE, CEP 62.042-280 Brazil

Corresponding author

Francisco Cesar Barroso Barbosa

Faculty of Medicine of Sobral, Avenida Comandante Maurocélio Rocha Ponte, 100, Derby, Sobral – CE, Brazil. Zip Code: 62-042-280 Phone: +55 (88) 3611.2202 E-mail: fcbbarbosa@yahoo.com.br

23

24

25

26

27

28

Abstract

Background/Purpose(s): *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen resistant to several antimicrobials. We aimed to investigate the sensitivity profile and frequency of OXA-type carbapenemases among *A. baumannii* nosocomial strains isolated from patients in teaching hospitals of Ceará, Brazil.

Methods: From November 2016-April 2017, *A. baumannii* nosocomial strains from four teaching hospitals were analyzed. All isolates were identified, and the antimicrobial susceptibility profile established by VITEK®2. Polymerase chain reaction (PCR) to amplify the bla_{OXA-51} gene was performed on all presumptively strains identified as *A. baumannii*, and minimum inhibitory concentrations were determined by thebroth microdilution for tigecycline- resistant isolates. Furthermore, bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, and bla_{OXA-58} genes were detected by PCR.

Results: A total of 167 *A. baumannii* nosocomial strains were analyzed, from which 101 (60.5%) were from patients in intensive care units, 54 (32.3%) were isolated from the bloodstream, and 142 (85.0%) were multi-drug resistant (MDR). 132 (79.0%) isolates were resistant to carbapenems, but all isolates were susceptible to colistin and most of them were susceptible to tigecycline. The majority harbored the bla_{OXA-23} gene, these datawere significantly associated with an MDR phenotype. In addition, 45 (26.9%) contained bla_{OXA-24}, four strains harbored concomitantly bla_{OXA-23} and bla_{OXA-24} and no bla_{OXA-58} gene was detected.

Conclusion: These results demonstrated high resistance rates to the different antimicrobial drugs analyzed and a high frequency of bla_{OXA-23} gene, suggesting that colistin and tigecycline could be the therapeutic options for the treatment of infections associated with MDR *A. baumannii*.

Keywords: Acinetobacter baumannii; beta-lactamases; carbapenems; cross infection; antimicrobial drug resistance.

Introduction

Acinetobacter is a microorganism genus represented by immobile, catalase positive, oxidase negative, and non-fermenting gram-negative coccobacillus. The genus is classified as part of the Moraxella family of the Gamma proteobacteria order. [1] *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen resistant to several antimicrobials and commonly associated with nosocomial infection outbreaks in intensive care units (ICU). In addition to being able to survive in dry environments for a long time, this microorganism is spread in the air, can contaminate the hands of health professionals and be isolated from the skin of colonized patients. [2]

In the scenario of antimicrobial resistance, carbapenem-resistant *A. baumannii* has been listed by the World Health Organization as the main priority pathogen for urgent new antimicrobial research. [3] In Brazil, *A. baumannii* has emerged as a major nosocomial pathogen, causing infections in ICUs with numerous outbreaks, especially involving isolates resistant to carbapenems. [4]

A. baumannii becomes resistant to carbapenems by acquiring genes that encode enzymes to degrade these antibiotics. These enzymes also interfere with drug permeability, and/or alter the affinity of the antimicrobial target for the carbapenems. Ambler Class B (metalloenzymes) and class D (oxacillinases) are the most common enzymes involved in the mechanisms of resistance to carbapenems, being the OXA β-lactamases the most prevalent enzyme type. Although more than 250 types of OXA have been described, higher importance is given to four carbapenemase groups. They are OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like and OXA- 51-like. [5] The OXA-23 subgroup was identified in several countries, including Brazil. [5-7] Resistance to carbapenems increases significantly when OXA genes are overlapped next to insertion sequences with promoter functions, such as the element ISAba1. [8]

Nosocomial infection is considered a topic of concern that is growing in incidence and complexity. Moreover, this type issue affects the social and economic aspects of different populations worldwide. Hospital infection rates in university hospitals are often higher than in other health facilities. When such infections are caused by multiresistant

bacteria, they are associated with higher hospital admissions costs, prolonged hospitalization, and higher morbidity and mortality rates.[9]

Given the exposed, the aim of this study was to investigate the sensitivity profile of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients with nosocomial infections treated in university hospitals of Ceará, Brazil. It was also investigated the occurrence of the OXA-type carbapenemases among the nosocomial isolates.

Material and Methods

Ethical aspects

This study was approved by the Ethics Committee of Research of the institution where the investigation was performed. Privacy was guaranteed, and patients were identified by their hospital registration numbers to ensure that only researchers had access to their information.

Study setting and bacterial strains

This is an observational and crossover study in which it was investigated the occurrence of *A. baumannii in* patients with nosocomial infection. These patients were under medical supervision in four university hospitals of Ceará - Brazil: Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS), Hospital Geral de Fortaleza (HGF), Hospital Geral César Cals (HGCC), and Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). Nosocomial species of *A. baumannii* were isolated from blood, tracheal aspirate fluid, percutaneous catheter tip, urine, abscess secretion, and surgical wound of patients receiving treatment in ICUs. All isolates were identified, and their antimicrobial susceptibility profile was analyzed by VITEK®2 automated system (BioMérieux, Marcy-l'Eileile, France) for the following drugs: ampicillin/sulbactam, amikacin, ampicillin, ceftriaxone, cefoxitin, ceftazidime, cefuroxime, cefuroxime, ciprofloxacin, colistin gentamicin, cefepime, imipenem, meropenem, piperacillin/tazobactam and tigecycline. Multi-drug resistance (MDR) was defined as resistance to three or more classes of the drugs tested. [10] Additionally, polymerase chain reaction (PCR) was performed on all presumptively identified *A. baumannii* isolates to amplify the $bla_{\text{OXA-}51}$ gene. [11] The Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) were determined through broth microdilution technique for isolates resistant to tigecycline following the recommendations of the Clinical and Laboratory Institute Standards. [12]

Detection of carbapenem resistance genes

Nosocomial species of *A. baumannii* were analyzed for the detection of bla_{OXA} genes through PCR. The primers and protocols previously described were used to amplify the

genes *bla* $_{OXA-23}$, *bla* $_{OXA-24}$, *bla* $_{OXA-51}$ and *bla* $_{OXA-58}$. [13] The sequence of the fragments that were amplified, as well as the size of the amplicons, are described in Table 1.

The amplification reactions were prepared with 25µL suspension of colony forming units of the strains to be analyzed, 12.5µL of Taq Pol-Master Mix (2x) Green (Cellco Biotec, São Paulo, Brazil) containing dNTPs (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), KCL, $MgCl_2$, dye, gel loading buffer and stabilizers, 8.5 µL of H_2O and 2.0 µL of each primer and 1x buffer reaction (final concentration) were added. Cyclic parameters for amplifying the fragment corresponding to the coding region of the *bla* $_{OXA}$ gene were carried out according to the manufacturer's instructions (Taq Pol-Master Mix (2x) Green - Cellco Biotec, São Paulo, Brazil). These reactions were performed in the following sequence: initial denaturation (95° C for 1 min); followed by 30 cycles of denaturation (94° C for 30 seconds and 53 ° C for 30 seconds), annealing (72° C for 45 seconds) and a final extension at 72° C for 4 min. The amplified products were analyzed on 1.0% agarose gel with 0.5X TBE buffer. The electrophoresis was performed at 120 volts for 40 minutes. The application on the agarose gel was performed with 8µl of the reaction added with 2µl of bromophenol blue solution. The 100 bp molecular weight marker (Invitrogen, USA) was applied to the gel to determine the size of the fragments obtained.

Statistical analysis

Data were expressed as absolute and percentage frequency and analyzed using Fisher's exact test or Pearson's Chi-square test. After that, for the frequency of *bla*$_{OXA-23}$ and *bla*$_{OXA-24}$ genes expression, it was used the Forward Stepwise model to select variables with $p < 0.200$ for multinomial logistic regression. All analyzes were performed in the software Statistical Package for the Social Sciences adopting a confidence of 95%.

Results

In this study, 167 nosocomial strains of *A. baumannii* isolated from patients of four university hospitals were analyzed. Table 2 depicts the distribution of the isolates per hospital unit, isolation site, hospital sector, gender and frequency of occurrence of *bla* $_{OXA-23}$ and *bla* $_{OXA-24}$ genes. It was observed that A. baumannii was more frequently isolated from the bloodstream, followed by tracheal aspirate and surgical wound. Most of the strains were isolated from patients hospitalized in Intensive Care Units, followed by clinical and neurology wards, and maternity (Table 2). In addition, four isolates harbored concomitant *bla* $_{OXA-23}$ and *bla* $_{OXA-24}$ genes, but in none of them *bla* $_{OXA-58}$ gene wasdetected.

The strains of *A. baumannii* isolated from patients of all hospitals under study were susceptible to colistin and most of them were susceptible to tigecycline. However, these isolates showed high resistance to carbapenems. The antimicrobial resistance profiles of the isolates are described in Table 3.

As Table 3 shows, multi-drug resistance was observed in 142 (85%) out of the 167 strains isolated. Seventy-three (43.7%) out of these 142 highly resistant strains harbored *bla* $_{OXA-23}$ gene, while 42 (25.1%) expressed the *bla* $_{OXA-24}$ gene. The concomitant presence of the *bla* $_{OXA-23}$ and *bla* $_{OXA-24}$ genes was significantly associated ($p < 0.05$) with the phenotype of resistance to carbapenems, cefepime, ceftazidime, gentamicin and piperacillin/tazobactam.

The presence of the *bla* $_{OXA-23}$ gene was statistically significant ($p = 0.03$) only in strains with the amikacin resistance phenotype, while the presence of the *bla* $_{OXA-24}$ gene was statistically significant in strains with the ceftriaxone and ciprofloxacin resistance phenotype ($p < 0.05$). No statistically significant association was found between the presence of the *bla* $_{OXA-23}$ and *bla* $_{OXA-24}$ genes and the resistance profile of the *A. baumannii* nosocomial strains to the other antimicrobials tested.

The *bla* $_{OXA-23}$ gene was found in 34.6% of the strains of *A. baumanni* isolated from the bloodstream, while 19 (42.2%) were isolated from tracheal aspirate ($p = 0.004$) and expressed the *bla* $_{OXA-24}$ gene. In addition, the *bla* $_{OXA-24}$ gene was detected more in the *A.*

baumannii strains isolated from two of the university hospitals under study (HGCC and HGF) than from the others ($p < 0.001$). No statistically significant correlation was observed between the presence of the *bla* $_{OXA-23}$ and *bla* $_{OXA-24}$ genes with the hospital sector and the gender of hospitalized patients (Table 4).

225

Discussion

Infections caused by *A. baumannii* and the resistance development are issues that are increasingly frequent and should be tackled properly worldwide. [5] Our findings show that *A. baumannii* isolates from blood samples (32.3%) and the tracheal aspirate (25.1%), corroborating with available data from other Brazilian hospitals. [4,5,14,15]

Most of the *A. baumannii* nosocomial strains were isolated from male patients (59.9%), aligning with results from Castilho et al. 2017 (59.4%) and Chang *et al*. 2015 (59.7%). [5,16]

All hospitals included in this study had the intensive care units as the major source of *A. baumannii* isolates similarly to Raro *et al*. 2017, Castilho *et al*. 2017, Kooti *et al*. 2015, and Li et al. 2017. [2, 5, 6, 17] These findings are alarming because intensive care units can serve as a reservoir for these opportunistic pathogens and so often the patients under intense care are already at higher risk once they can be immunologically debilitated. These patients may use invasive medical appliances such as catheters as well as under broad-spectrum antimicrobial therapy. Lowing et al. 2015 [18] point out that the excessive and indiscriminate use of antimicrobial drugs accounts for the rocketing incidence of highly resistant microorganisms in intensive care units.

In this study, 85% of *A. baumannii* nosocomial strains were multidrug resistant and the resistance rates to imipenem and meropenem reached 79%. In the last few years, this species has been reported to be resistant to many antimicrobial drugs and resistance rates to imipenem, meropenem, ceftazidime, piperacillin/tazobactam, ciprofloxacin, and gentamicin in Latin America seem to among the highest globally. [19] These resistance rates to carbapenems are higher than what is reported in China, Saudi Arabia, Greece, Italy, and the USA where these rates were 29.4%, 69%, 57.4%, 45.7%, and 34%, respectively. [20-24]

Previous Brazilian studies demonstrated growing resistance rates of *A. baumannii* strains to many important antimicrobial drugs, especially imipenem and meropenem. [15,25,26] It has also been reported an increase in the resistance rates of this strain in Qatar, Spain, China, Indonesia, Morocco, Iran, and Lebanon. [7,19,27-30]

Carbapenem-resistant *A. baumannii* strains isolated from the hospitals in this study also showed high rates of co-resistance to a wide range of antimicrobial drugs except for tigecycline and colistin. All isolates were sensible to colistin like the data found in Algeria and Iran, even so decreased resistance rates were reported in Saudi Arabia (70.90%), Kuwait (92.5%), and Egypt (95%).[31, 32] However, tigecycline and colistin continue to be therapeutic options for treating infections caused by carbapenemases-producing bacteria.

[2,5,27,33]

The multiple drug-resistant *A. baumannii* clinical isolates analyzed here constitute a very concerning therapeutic issue as they can mean an unfavorable prognosis when treating serious infections caused by these pathogens. These findings reinforce the idea of an increasing resistance of bacteria to carbapenems which can imply in the dissemination of highly resistant strains [34,35], particularly when such resistance is mediated by mobile elements that can be readily transferred and disseminated among isolates. [2]

bla $_{OXA-51}$ gene was prevalent between nosocomial isolates of *A. baumannii* in this study as reported by many other groups globally [5,6,16,19,27-31], confirming studies that suggest the presence of this gene as an intrinsic to this species as it is in its chromosome. [8] Albeit this gene is not restricted to *A. baumannii*, it is indeed present in most of the strains of this species. [6] Contrarily, the high prevalence of *bla* $_{OXA-23}$ in the analyzed isolates could be a result of horizontal transference as this gene frequently origins from the plasmid, transposons e insertion sequences. [36] Besides, *bla* $_{OXA-58}$ gene was not detected in thisstudy, but OXA-58 *A. baumanni* strains have been poorly detected in other Brazilian regions. [37]

The resistance to carbapenems in *A. baumanni* strains results from the production of acquired oxacillinases such as OXA-23, OXA-24, and OXA-58, whilst OXA-153 and OXA-72 are less frequent. The OXA-23 production has been often identified in carbapenem-resistant *A. baumannii* strains isolated from hospitalized patients .[2,5-7,13,14,17] These infections are associated with high morbidity and mortality rates and contribute to extend hospitalization periods and high care costs. [1] Isolated outbreaks that house codifying-carbapenemases groups, especially the OXA type (*bla* $_{OXA-23}$, *bla* $_{OXA-24}$, *bla* $_{OXA-51}$, and *bla* $_{OXA-58}$) are even more frequent on a global scale. [16]

As previously mentioned, the gene responsible for OXA-23 and OXA-24 production was found in 46.7% and 26.9% of the isolates in this study, respectively. This frequency is similar to results described by other groups [5-7,15,16,30,36]. Besides, the co-occurrence of two types of OXA was also reported in *A. baumannii*.[5] Here, the coexistence of *bla* $_{OXA-23}$ and *bla* $_{OXA-24}$ occurred in four isolates.

Nonetheless, 6.8% of the nosocomial isolates of *A.baumannii* resistant to carbapenems analyzed here did not express *bla* $_{OXA-23}$ and *bla* $_{OXA-24}$. In such case, the resistance to imipenem and meropenem can be explained due to the presence of *ISAba1* element. Therefore, the presence of this insertion sequence or ISA*ba9* can be necessary to enhance the expression of other mechanisms such as a reduced permeability of the external membrane or excessive expression of efflux pumps. [38, 38]

The propagation of *A. baumannii* nosocomial strains that are multidrug resistant and OXA producers is a relevant public health issue. The emergence of these strains is associated with high rates of resistance to antimicrobial drugs commonly used in the clinical care, which hinders the nosocomial infection treatment. The identification of phenotypes and genotypes of OXA is of extreme relevance for a proper clinical management, avoiding thus the emergence and dissemination of outbreaks as well as establishing a different therapeutic approach that preferentially includes the combined use of antibacterial drugs.

This study showed that the occurrence of *bla* $_{OXA-24}$ gene was strongly associated with samples obtained from tracheal aspirates. Pneumonia associated with mechanical ventilation is one of the most frequent infections caused by these pathogens. [40]

In conclusion, these data indicate a high frequency of nosocomial isolates of multidrug-resistant *A. baumannii* strains in the analyzed hospitals, being the majority resistant to carbapenems and sensible to colistin and tigecycline. The most frequent mechanisms of resistance observed was the production of carbapenemases, notably OXA-23. Therefore, these findings can substantially support epidemiological databases, which is related to the basic principle of monitoring which, in turn, is the basis for implementing measures to fight off nosocomial infections such as therapeutic protocols, improving the assistance provided for hospitalized patients.

Acknowledgments

This study was supported by Brazilian grants from Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

1. Ballouz T, Aridi J, Afif C, Irani J, Lakis C, Nasreddine R, et al. Risk Factors, Clinical Presentation, and Outcome of Acinetobacter baumannii Bacteremia. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2017;7.
2. Raro OHF, Gallo SW, Ferreira CAS, de Oliveira SD. Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii contamination in an intensive care unit. Rev Soc Bras Med Trop. 2017;50(2):167–72.
3. World Health Organization, 2017.
4. Dias VC, Diniz CG, Peter ACDO, Bastos AN, Bastos VQDA, Bastos LQDA, et al. Epidemiological characteristics and antimicrobial susceptibility among carbapenem-resistant non-fermenting bacteria in Brazil. J Infect Dev Ctries. 2016;10(6):544–53.
5. Castilho SRA, Godoy CSDM, Guilarde AO, Cardoso JL, André MCP, Junqueira-Kipnis AP, et al. Acinetobacter baumannii strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. PLoS One. 2017;12(5).
6. Kooti S, Motamedifar M, Sarvari J. Antibiotic Resistance Profile and Distribution of Oxacillinase Genes Among Clinical Isolates of Acinetobacter baumannii in Shiraz Teaching Hospitals, 2012 - 2013. Jundishapur J Microbiol [Internet]. 2015;8(8):e20215.
7. Rolain JM, Loucif L, Al-Maslamani M, Elmagboul E, Al-Ansari N, Taj-Aldeen S, et al. Emergence of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii producing OXA-23 Carbapenemase in Qatar. New Microbes New Infect. 2016;11:47–51.
8. Sohrabi N, Farajnia S, Akhi MT, Nahaei MR, Naghili B, Peymani A, et al. Prevalence of OXA-type β-lactamases among Acinetobacter baumannii isolates from Northwest of Iran. Microb Drug Resist [Internet]. 2012;18(4):385–9.
9. Evans HL, Lefrak SN, Lyman J, Smith RL, Chong TW, McElearney ST, et al. Cost of Gram-negative resistance. Crit Care Med. 2007;35(1):89–95.

10. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, 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. 2012;18(3):268–81.

11. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of Acinetobacter baumannii by detection of the bla OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol. 2006;44(8):2974–6.

12. Clinical Laboratory Standards Institute – CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI document. Wayne: CLSI; 2018.

13. Ma Z, Zhou LQ, Wang H, Luo LP. Investigations on the genomic diversity of OXA from isolated Acinetobacter baumannii. Genet Mol Res. 2015;14(4):14711–6.

14. Chagas TPG, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in Brazil (2008-2011): Countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). Diagn Microbiol Infect Dis 2014;79(4):468–72.

15. Neves FC, Clemente WT, Lincopan N, Paião ID, Neves PR, Romanelli RM, et al. Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing Acinetobacter baumannii in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. Brazilian J Infect Dis [Internet]. 2016;20(6):556–63.

16. Chang Y, Luan G, Xu Y, Wang Y, Shen M, Zhang C, et al. Characterization of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates in a Chinese teaching hospital. Front Microbiol. 2015;6(SEP).

17. Li Y jun, Pan C zhi, Fang C quan, Zhao Z xiang, Chen H ling, Guo P hao, et al. Pneumonia caused by extensive drug-resistant Acinetobacter baumannii among hospitalized patients: Genetic relationships, risk factors and mortality. BMC Infect Dis. 2017;17(1).

18. Lowings M, Ehlers MM, Dreyer AW, Kock MM. High prevalence of oxacillinases in clinical multidrug-resistant Acinetobacterbaumannii isolates from the Tshwane region, South Africa - an update. BMC Infect Dis. 2015;15(1).

19. Al Atrouni A, Hamze M, Jisr T, Lemarié C, Eveillard M, Joly-Guillou ML, et al. Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii

belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. Int J Infect Dis. 2016;52:29–36.

20. Ying J, Lu J, Zong L, Li A, Pan R, Cheng C, et al. Molecular epidemiology and characterization of genotypic analysis of Acinetobacter baumannii strains isolates from south China. Jpn J Infect Dis [Internet]. 2016;69:180–5.

21. Ying J, Lu J, Zong L, Li A, Pan R, Cheng C, et al. Molecular epidemiology and characterization of genotypic analysis of Acinetobacter baumannii strains isolates from south China. Jpn J Infect Dis [Internet]. 2016;69:180–5.

22. Al-Sultan AA, Evans BA, Aboulmagd E, Al-Qahtani AA, Bohol MFF, Al-Ahdal MN, et al. Dissemination of multiple carbapenem-resistant clones of Acinetobacter baumannii in the Eastern District of Saudi Arabia. Front Microbiol. 2015;6(JUL).

23. Principe L, Piazza A, Giani T, Bracco S, Caltagirone MS, Arena F, et al. Epidemic diffusion of OXA-23-producing acinetobacter baumannii isolates in Italy: Results of the first cross-sectional countrywide survey. J Clin Microbiol. 2014;52(8):3004–10.

24. Kallen AJ, Srinivasan A. Current Epidemiology of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli in the United States. Infect Control Hosp Epidemiol [Internet]. 2010;31(S1):S51–4.

25. Cieslinski JM, Arend L, Tuon FF, Silva EP, Ekermann RGS, Dalla-Costa LM, et al. Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence-based PCR. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;77(4):337–40.

26. Vasconcelos ATR, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucarevschi BR, et al. The changing epidemiology of Acinetobacter spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: A BrasNet report. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015;83(4):382–5.

27. Dahdouh E, Gómez-Gil R, Pacho S, Mingorance J, Daoud Z, Suárez M. Clonality, virulence determinants, and profiles of resistance of clinical Acinetobacter baumannii isolates obtained from a Spanish hospital. PLoS One. 2017;12(4).

28. Chen F, Wang L, Wang M, Xie Y, Xia X, Li X, et al. Genetic characterization and inï¿½vitro activity of antimicrobial combinations of multidrug-resistant

Acinetobacter baumannii from a general hospital in China. Oncol Lett [Internet]. 2017;2305–15.

29. Saharman YR, Karuniawati A, Sedono R, Aditianingsih D, Sudarmono P, Goessens WHF, et al. Endemic carbapenem-nonsusceptible Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex in intensive care units of the national referral hospital in Jakarta, Indonesia. Antimicrob Resist Infect Control [Internet]. Antimicrobial Resistance & Infection Control; 2018;7:5.
30. Uwingabiye J, Lemnouer A, Roca I, Alouane T, Frikh M, Belefquih B, et al. Clonal diversity and detection of carbapenem resistance encoding genes among multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolates recovered from patients and environment in two intensive care units in a Moroccan hospital. Antimicrob Resist Infect Control. 2017;6(1).
31. Josheghani SB, Moniri R, Firoozeh F, Sehat M, Goli YD. Susceptibility Pattern and Distribution of Oxacillinases and bla PER-1 Genes among Multidrug Resistant Acinetobacter baumannii in a Teaching Hospital in Iran. J Pathog. 2015;2015(957259):7.
32. Al-Agamy MH, Khalaf NG, Tawfick MM, Shibl AM, Kholy A El. Molecular characterization of carbapenem-insensitive Acinetobacter baumannii in Egypt. Int J Infect Dis. 2014;22.
33. Hagihara M, Housman ST, Nicolau DP, Kuti JL. In vitro pharmacodynamics of polymyxin B and tigecycline alone and in combination against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(2):874–9.
34. Aljindan R, Bukharie H, Alomar A, Abdalhamid B. Prevalence of digestive tract colonization of Carbapenem-Resistant acinetobacter baumannii in hospitals in Saudi Arabia. J Med Microbiol. 2015;64(4):400–6.
35. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:3471–84.
36. Mohajeri P, Farahani A, Mehrabzadeh RS. Molecular characterization of multidrug resistant strains of Acinetobacter baumannii isolated from intensive care units in west of Iran. J Clin Diagnostic Res. 2017;11(2):DC20-DC22.

37. Gusatti C de S, Bertholdo LM, Otton LM, Marchetti DP, Ferreira AE, Corção G. First occurrence of blaOXA-58 in Acinetobacter baumannii isolated from a clinical sample in Southern Brazil. Brazilian J Microbiol. 2012;43(1):243–6.

38. Figueiredo S, Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P. Overexpression of the naturally occurring blaOXA-51gene in Acinetobacter baumannii mediated by novel insertion sequence ISAba9. Vol. 53, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009. p. 4045–7.

39. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2011;17(10):1791–8.

40. Sohrabi N, Farajnia S, Akhi MT, Nahaei MR, Naghili B, Peymani A, et al. Prevalence of OXA-type β-lactamases among Acinetobacter baumannii isolates from Northwest of Iran. Microb Drug Resist [Internet]. 2012;18(4):385–9.

Table

Table 1 – Nucleotide sequence for the amplification of the genes *bla*$_{OXA}$.

Primer	Nucleotide sequence (5’ 3’)	Amplification (Bp)
***Bla*$_{OXA23}$F**	GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA	501 bp
***Bla*$_{OXA23}$R**	ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	
***Bla*$_{OXA24}$F**	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	246 bp
***Bla*$_{OXA24}$R**	AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	
***Bla*$_{OXA51}$F**	TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353 bp
***Bla*$_{OXA51}$R**	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	
***Bla*$_{OXA58}$F**	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	599 bp
***Bla*$_{OXA58}$R**	CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	

13

14

15

16

17

18

19

Table 2 - Distribution of the isolates per hospital unit, isolation site, hospital sector, gender and frequency of occurrence of *bla* $_{OXA-23}$ and *bla* $_{OXA-24}$ genes.

	n	%
Microorganism		
Acinetobacter baumannii	167	100.0
Hospital unit		
SCMS	75	44.9
HGCC	32	19.2
HGF	42	25.1
HUWC	18	10.8
Isolation site		
Blood	54	32.3
Tracheal aspirate	42	25.1
Secretion	24	14.4
Other	47	28.1
Hospitalization sector		
UTI	101	60.5
Other	66	39.5
Gender		
Female	67	40.1
Male	100	59,9
***bla* $_{OXA-23}$**	78	46.7
***bla* $_{OXA-24}$**	45	26.9

33

Table 3 - Antimicrobial resistance profile of *A. baumannii* strains isolated from patients hospitalized in four university hospitals.

	Resistant		Sensitive		Intermediate	
Antimicrobial	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
Amikacin	59	42.4	68	48.9	12	8.6
Ampicillin	165	98.8	0	0.0	2	1.2
Ampicillin sulbactan	70	44.0	38	23.9	51	32.1
Cefepime	131	78.4	28	16.8	8	4.8
Cefoxitin	152	95.6	5	3.1	2	1.3
Ceftazidime	128	80.5	26	16.4	5	3.1
Ceftriaxone	128	76.6	6	3.6	33	19.8
Cefuroxime	166	99.4	0	0.0	1	0.6
Cefuroxime axetil	164	98.8	2	1.2	0	0.0
Ciprofloxacin	133	79.6	34	20.4	0	0.0
Colistin	0	0.0	159	100.0	0	0.0
Gentamicin	68	40.7	84	50.3	15	9.0
Imipenem	132	79.0	35	21.0	0	0.0
Meropenem	132	79.0	33	19.8	2	1.2
Piperacillin / tazobactam	137	82.0	28	16.8	2	1.2
Tigecycline	4	2.5	146	91.8	9	5.7

Data expressed as absolute frequency and percentage.

Table 4 - Frequency of the *bla* $_{OXA-23}$ and *bla* $_{OXA-24}$ genes by hospital unit, isolation site, hospitalization sector, and gender.

	bla **OXA-23**			***bla*** **OXA-24**		
	Absent	**Present**	**p-Value**	**Absent**	**Present**	**p-Value**
Hospital unit						
SCMS	34	41	0.294	66*	9	***<0.001***
	38.2%	52.6%		54.1%	20.0%	
HGCC	18	14		18	14*	
	20.2%	17.9%		14.8%	31.1%	
HGF	26	16		21	21*	
	29.2%	20.5%		17.2%	46.7%	
HUWC	11	7		17	1	
	12.4%	9.0%		13,9%	2,2%	
Isolation site	24	18	0.469	23	19*	***0.004***
	27.0%	23.1%		18.9%	42.2%	
Blood	27	27		47*	7	
	30,3%	34,6%		38.5%	15.6%	
Secretion	10	14		19	5	
	11.2%	17.9%		15.6%	11.1%	
Outros	28	19		33	14	
	31.5%	24.4%		27.0%	31.1%	
Hospitalization sector						
UTI	55	46	0.710	75	26	0.655
	61.8%	59.0%		61.5%	57.8%	
Others	34	32		47	19	
	38.2%	41.0%		38.5%	42.2%	
Gender						
Female	34	33	0.589	49	18	0.985
	38.2%	42.3%		40.2%	40.0%	
Male	55	45		73	27	
	61.8%	57.7%		59.8%	60.0%	

*p<0.05, Fisher's exact test or Pearson's Chi-square test. Data expressed as absolute frequency and percentage.

57

Cover Letter

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

March 04th, 2018

To the Editor

Journal of Microbiology, Immunology and Infection

Please find attached the electronic version of the article entitled: **"High Frequency of OXA-Type Carbapenemases Among *Acinetobacter baumannii* Strains in Teaching Hospitals of Ceará, Brazil**" authored by Barbosa et al, which we are submitting for publication. The article was prepared according to the Author Guidelines as provided on the electronic home page of **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. We declare that this is a new submission, and the manuscript has no and will not be published in whole or in part in any other journal. In addition, we inform that the manuscript has been read and approved by all authors. We also understand that the exclusive licence to publish the article and illustrative materials there in all forms of media shall be granted to **Journal of Microbiology, Immunology and Infection** if the manuscript is accepted for publication.

Yours sincerely,

REFERÊNCIAS

ABBOTT, I. ABBOTT, I.; CERQUEIRA, G. M.; BHUIYAN, S.; PELEG, A. Y. 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.

AL-AGAMY M. H.; KHALAF N. G.; TAWFICK M. M.; SHIBL A. M.; KHOLY A. E. Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt. ***International Journal of Infectious Diseases***, v. 22, p. 49–54, 2014.

AL ATROUNI, A.; HAMZE, M.; JISR, T.; LEMARIÉ, C.; EVEILLARD, M.; JOLY-GUILLOU, M. L.; KEMPF, M. Wide spread of **OXA**-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. **Int J Infect Dis.** v. 52, p. 29-36, 2016.

ALJINDAN, R.; BUKHARIE, H.; ALOMAR, A.; ABDALHAMID, B. Prevalence of digestive tract colonization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Saudi Arabia. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. 4, p. 400-406, 2015.

AL-SULTAN, A. A.; EVANS, B. A.; ABOULMAGD, E.; AL-QAHTANI, A. A.; BOHOL, M. F.; AL-AHDAL, M. N. et al.Dissemination of multiple carbapenem-resistant clones of *Acinetobacter baumannii* in the Eastern District of Saudi Arabia**. Front Microbiol**, v. 6, n. 634, 2015.

ANSALDI, F.; CANEPA, P.; BASSETTI, M.; ZANCOLLI, M. *et al.* Sequential outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units of a tertiary referral hospital in Italy: combined molecular approach for epidemiological investigation. **J Hosp Infect** , v. 79, n. 2, p. 134-40, 2011.

ANTONIO, C. S. *et al.* Surto de *Acinetobacter baumannii* resistente a múltiplos medicamentos: Caracterização de genes semelhantes a bla-OXA-23 . Em: 1º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA (SIMC), Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil, 2008.

ANTONIO, C. S. *et al.* Disseminação e emergência de genes blaOXA-23, blaOXA-58, blaOXA-72 e sequências de inserção (IS) em isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos . Em: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM), Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, 2009, n. 1508-1

BALLOUZ, T.; ARIDI, J.; AFIF, C.; ARANI, J.; LAKIS, C.; NASREDDINE, R.; AZAR, E. Risk Factors, Clinical Presentation, and Outcome of *Acinetobacter baumannii* Bacteremia. **Ront Cell Infect Microbiol,** v. 7, n. 156, 2017.

BAUMANN, P; DOUDOROFF, M.; STANIER , R. Y. A Study of the *Moraxella* Group II. Oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*). **J. Bacteriol**, v. 95, n. 5, p. 1520-1541, 1968.

BEIJERINCK M. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. **Vers Konin Akad Wet Ams**. v. 19, p. 1092–1103, 1911.

BIALVAEI, A.Z. *et al*. Dissemination of carbapenemases producing Gram negative bacteria in the Middle East. **Irã J Microbiol**, v. 7, n. 5, p. 226-246, 2015.

BROWN, S.; AMYES, S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. **J Antimicrob Chemother,** v. 57, n. 1, p. 1-3, 2006.

BRIGOTTI, M. *et al*. Endothelial damage induced by Shiga toxins delivered by neutrophils during transmigration. **Journal Of Leukocyte Biology,** v. 88, n.1, p.201-210, 2010.

BRISOU, J; PREVOT A. R. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Achromobacter group. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 86, n. 6, p. 722-728, 1954.

CALHOUN, JH *et al.* Organismos multirresistentes em feridas militares do Iraque e do Afeganistão. **Clin Orthop Relat Res** , v. 466, n. 6, p.1356-62, 2008.

CARVALHO, *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.

CARVALHO, K. R. *et al.* Disseminação de genótipos multirresistentes de Acinetobacter baumannii produtores de carbapenemase OXA-23 em diferentes estados do Brasil. *Em:* 26º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA (CBM), Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2011, n. 962-1.

CARVALHO, K. R. *et al.* Disseminação de genótipos de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes com *bla* (OXA-23) coletados em hospitais do Rio de Janeiro, Brasil**. Int J Antimicrob Agents** , v. 34, n. 1, p. 25-8, 2009.
(CC15 and CC79). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 4, p. 468–472, 2014.

CHUANG, Y. C.; SHENG, W. H.; LAUDERDALE, T. L.; LI, S. Y.; WANG, J. T.; CHEN, Y. C.; CHANG, S. C. Epidemiologia molecular, susceptibilidade antimicrobiana e determinantes da resistência àcarbapenemase entre isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* em Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect.** v. 47, n. 4, p. 324-332, 2014.

CHANG, Y.; LUAN, G.; XU, Y.; WANG, Y.; SHEN, M.; ZHANG, C.;, ZHENG, W.; HUANG, J.; YANG, J.; JIA, X.; LING, B. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a Chineseteaching hospital. **Front Microbiol.** v. 1, n. 6, p. 910, 2015.

CHEN, F.; WANG, L .; WANG, M.; XIE, Y.; XIA, X.; LI, X.; LIU, Y.; CAO, W.; ZHANG, T.; LI, P.; YANG, M. Genetic characterization and in vitro activity of antimicrobial combinations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from a general hospital in China. **Oncol Lett**, v. 15, n. 2, p. 2305-2315, 2018.

CHROMA, M.; KOLAR, M. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: Focus on extended spectrum β-lactamases. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky**. v. 154, n. 4, p.289–296, 2010.

CIESLINSKI, J. M.; AREND, L.; TUON, F. F.; SILVA, E. P.; EKERMANN, R. G.; DALLA-COSTA, L. M., *et al*. Caracterização epidemiológica molecular de *Acinetobacter baumannii*, produzido com carbapenemase de OXA-23, isolado de 8 hospitais brasileiros usando PCR repetitiva baseada em seqüência. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 77, p. 337-340, 2013

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI document. Wayne: CLSI; 2018.

DAHDOUH, E.; GÓMEZ-GIL, R.; PACHO, S.; MINGORANCE, J.; DAOUD, Z.; SUÁREZ, M. Clonality, virulence determinants, and profiles of resistance of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from a Spanish hospital. **PLoS One**, v. 12, n. 4, 2017.

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.

DIENSTMANN, R. *et al*. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.

DIAS, V. C.; DINIZ, C. G.; PETER, A. C.; BASTOS, A. N.; BASTOS, V. Q.; BASTOS, L. Q.; ET, A. L. Epidemiological characteristics and antimicrobial susceptibility among carbapenem-resistant non-fermenting bacteria in Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v. 10, p. 544–53, 2016.

DJAHMI, N. *et al*. Epidemiology of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae and Acinetobacter baumannii in* Mediterranean Countries. **Biomed Research International,** v. 2014, n. 1, p.1-11, 2014.

DORTET, L. *et a*l. CarbAcineto NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter* spp. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 7, p. 2359–2364, 2014.

FERREIRA, A.E. *et al*. Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in Southern Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 17, n. 2, p. 221-227, 2011.

GARLANTÉZEC, R. *et al.* Investigação e gerenciamento de um surto de *Acinetobacter baumannii* resistente a imipenem em uma unidade de terapia intensiva. **Med Mal Infect** , v. 41, n. 8, p. 430-6, 2011.
GOGOU, V.; POURNARAS, S.; GIANNOULI, M.; VOULGARI, E.; PIPERAKI, E.T.; ZARRILLI, R. ,*et al*. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). **J Antimicrob Chemother**, v. 66, p. 2767–2772, 2011.

GUR, D. *et al.* Aumento da resistência ao carbapenem devido à disseminação clonal de oxacilinasa (OXA-23 e OXA-58) - produzindo *Acinetobacter baumannii* : relatório dos sites turcos do programa SENTRY. **J Med Microbiol** , v. 57, n. 12, p. 1529-32, 2008

GUSATTI , C. S.; BERTHOLDO, L. M.; OTTON, L. M.; MARCHETTI, D. P.; FERREIRA , A. E. Corção G. First occurrence of blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolated from a clinical sample in Southern Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 43, p. 243–6,2012.

JIA, X.; MA, W.; XU, X.; YANG, S.; ZHANG, L. Retrospective analysis of hospital-acquired linezolid-nonsusceptible enterococci infection in Chongqing, China, 2011-2014. **Am J Infect Control**, v. 43, n. 12, p. 101-106, 2015.

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

JOSHEGHANI, S. B.; MONIRI, R.; FIROOZEH, F.; SEHAT, M.; DASTEH GOLI,Y. Susceptibility Pattern and Distribution of Oxacillinases and *bla* $_{PER-1}$Genes among Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Teaching Hospital in Iran**. J Pathog,** v. 2015, 2015.

KALLEN, A. J.; SRINIVASAN, A. Current epidemiology of multidrug-resistant Gram-negative bacilli in the United States. **Infect Control Hosp Epidemiol, v.** 31, p. 51–S54, 2010.

KARMOSTAJI, A. ; PEERAYEH S. N. ; SALMANIAN A. H. Distribution of OXA-Type Class D β-Lactamase Genes Among Nosocomial Multi Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated in Tehran Hospitals. **Jundishapur J Microbiol** , v. 6, n. 5, p. 821-829, 2013.

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.

KOOTI, S.; MOTAMEDIFAR, M.; SARVARI, J. Antibiotic Resistance Profile and Distribution of Oxacillinase Genes Among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Shiraz Teaching Hospitals, 2012 - 2013. **Jundishapur J Microbiol**, v.8, n.8, p. 151-156, 2015.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment- A review- Part II. **Chemosphere**, v.75, n. 4, p. 435-441, 2009.

KUO, H. *et al.* Insertion Sequence Transposition Determines Imipenem Resistance inAcinetobacter baumannii. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 5, p. 410-415, 2014.

LIAKOPOULOS, A. *et al.* Identificação do *Acinetobacter baumannii*, produzido pela OXA-23 na Grécia, 2010 a 2011. **Euro Surveill** , v. 15, n. 17, p. 11, 2012.

LIN, M.F.; LAN, C.Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From benchtobed side. **World J Clin Cases**, v. 2, n. 12, p. 787–814, 2014.

LORENZINI, E.; COSTA, T.C.; SILVA, E.F. Prevenção e controle de infecção em unidade de terapia intensiva neonatal. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v.34, n.3, p.107-113, 2013.

LOWINGS, M. et al. High prevalence of oxacillinases in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from the Tshwane region, South Africa–an update. ***BMC infectious diseases***, *v.*15, n.1, p. 521, 2015.

MA, Z. *et al*. Investigations on the genomic diversity of OXA from isolated *Acinetobacter baumannii*. **Genet. Mol. Res.**, v. 14, n. 4, p. 14711-14716, 2015.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASA, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G., *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, p.268–281,2012.

MANAGEIRO, V. *et al.* Diversidade genética e evolução clonal dos isolados *Acinetobacter baumannii* resistentes ao carbapenem de Portugal e a disseminação do ST118. **Int J Antimicrob Agents** , v. 40, n. 5, p. 398-403, 2012.

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. Acinetobacter baumannii* resistente ao Carbapenem produzindo a enzima OXA-23: disseminação no sul do Brasil. **Infecção** , v. 37, n. 5, p. 474-6, 2009.

MARTINS, A.F.; BARTH, A.L. Acinetobacter spp.multirresistente –um desafio para a saúde pública. **Scientia Medica**, v. 23, n. 1, p. 56-62, 2013.

MATHERS, A.J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J.D.D. The role epidemic plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug resistant *Enterobacteriaceae*. **Clin Microbiol Reviews**, v. 28, n. 3, p. 565-591, 2015.

MENDES, R. E., *et al*. Comprehensive assessment of tigecycline activity tested against a world wide collection of *Acinetobacter* spp. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 68, n. 3, p. 307–311, 2010.

MOHAJERI, P.; FARAHANI, A.; MEHRABZADEH, R. S. Molecular Characterization of Multidrug Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Intensive Care Units in West of Iran. **J Clin Diagn Res**, v. 11, n. 2, p. 20-22, 2017.

MUGNIER, P.D. *et al* . Worldwide dissemination of the *bla* $_{OXA-23}$ carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis**, v.16, n. 1, p.35-40, 2010.

NIUMSUP, PR *et al. Acinetobacter baumannii* resistente ao Carbapenem produzindo OXA-23 na Tailândia. *Jpn J Infect Dis* , v. 62, n. 2, p. 152-4, 2009.

NEVES, F. C., *et al* . Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing *Acinetobacter baumannii* in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 556-563, 2016.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infections Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791-1798, 2011.

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

NORDMANN, P.; POIREL, L.; DORTET, L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infections Diseases**, v. 18, n. 9, p. 1503–1507 2012.

NOWAK, P. *et al.* Distribuição de genes *bla* OXA entre cepas nosocomiais de *Acinetobacter baumannii* resistentes ao carbapenem na Polônia. **New Microbiol** , v. 35, n. 3, p. 317-25, 2012.

OLIVEIRA, D.V. **ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS AMBIENTAIS DA FAMÍLIA *Enterobacteriaceae* QUANTO À PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA A β- LACTÂMICOS.** Dissertação de Doutorada. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017. Publishes List of Bacteria for Which NewAntibiotics Are Urgently Needed. Geneva: World Health Organization, 2017. Availableat: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/(Accessed Feb 23, 2018).

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..

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

PEREZ-PEREZ, F.J.; HANSON, N.D. Detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 7, p. 2153-2162, 2002.

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

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 24-38, 2010.

PRAGASAM, A.K. *et al* . Molecular characterisation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* during 2014 and 2015 collected across India. **Indian J Med Microbiol**, v. 34, n. 4, p. 433-441, 2016.

PRINCIPE, L.; PIAZZA, A.; GIANI, T.; BRACCO, S.; CALTAGIRONE, M.S.; ARENA, F., et al. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. **J Clin Microbiol**, v. 52, p. 3004–3010, 2014.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β-Lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

RARO, O.H.F. *et al*. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination in an intensive care unit.. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.50, n.2, p.167-172, 2017.

RASMUSSEN, W. J ; HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 3, p. 373-383, 2006.

ROLAIN, J. M.; LOUCIF, L.; AL-MASLAMANI, M.; ELMAGBOUL, E.; AL-ANSARI, N.; TAJ-ALDEEN, S.; SHAUKAT, A.; AHMEDULLAH, H.; HAMED, M. Emergence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 Carbapenemase in Qatar. **New Microbes New Infect**, v. 23, n. 11, p. 47-51, 2016.

SAHARMAN, Y. R.; KARUNIAWATI, A.; SEDONO, R.; ADITIANINGSIH, D.; SUDARMONO, P.; GOESSENS, W. H. F.; KLAASSEN, CHW[2], VERBRUGH HA[2], SEVERIN Ja. Endemic carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii-calcoaceticu*s complex in intensive care units of the national referral hospital in Jakarta, Indonesia. **Antimicrob Resist Infect Control.** 2018 Jan 12;7:5. doi: 10.1186/s13756-017-0296-7. eCollection 2018.

SOARES, G.M. *et al*. Mechanisms of action of systemic antibiotic sused in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resist anceto these drugs. **J. Appl. Oral. Sci**,, v. 20, n. 3, p. 295-309, 2012.

SOHRABI, N. *et al.* Prevalence of OXA-Type β-Lactamases Among *Acinetobacter baumannii* Isolates from Northwest of Iran. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 4, p. 385-389, 2012.

STOEVA, T. *et al.* Distribuição clonal de *Acinetobacter baumannii* resistente ao carbapenem resistente a OXA-23 em um hospital universitário búlgaro. **Clin Microbiol Infect** , v. 14, n. 7, p. 723-7, 2008.

TÄNGDÉN, T.; GISKE, C.G. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment an infection control. **J Intern Med**, v.277, n. 5, p. 501-512., 2015.

TARTARI, D.C. **Rastreio, Identificação E Caracterização Genética De Acinetobacter Spp. Isolados De Ambiente Hospitalar**. **Florianópolis-Sc**. 2016. 130 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina. Universidade Federal de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, 2016.

THOMSON, K. Extended-Spectrum-β-lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 4, p.1019–1025, 2010.

TOLEMAN, M.A. *et al* . Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother,** v. 50, n. 5, p. 673-679, 2002.

TUON, F.F.; ROCHA, J.L.; MERLINI, A.B. Combined therapy for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* infection-- isthere evidence outside thelaboratory? **J Med Microbiol**, v. 64, n. 9, p. 951-959, 2015.

UWINGABIYE, J.; LEMNOUER, A.; ROCA, I.; ALOUANE, T.,; FRIKH, M.; BELEFQUIH, B.; BSSAIBIS, F.; MALEB, A.; BENLAHLOU,Y.; KASSOUATI, J.; DOGHMI, N.; BAIT, A. Clonal diversity and detection of carbapenem resistance encoding genes among multidrug-re.sistant *Acinetobacter baumannii* isolates recovered from patients and environment in two intensive care units in a Moroccan hospital. **Antimicrob Resist Infect Control,** v. 6, n. 99, 2017.

VASCONCELOS, A. T., *et al*. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a Bras Net report. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 83, n. 4, p. 382-385, 2015.

VIEIRA, P.B.; PICOLI, S.U. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Clinical and Epidemiological Aspects. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 19, n. 2, p. 151-156, 2015.

VIEHMAN, J. A.; NGUYEN, M. H.; DOI, Y. Treatment Options for Carbapenem-Resistantand Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. **Drugs**, v.74, n. 12, p. 1315–1333, 2015.

YING, J.; LU, J.; ZONG, L.; LI, A.; PAN, R.; CHENG, C., *et al*. Molecular epidemiology and characterization of genotypic analysis of *Acinetobacter baumannii* strains isolates from south China. **Jpn J Infect Dis**, v. 69, p. 180–18, 2015.

ANEXO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Caro participante:

Sou farmacêutica bioquímica, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde na Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral e estou desenvolvendo uma pesquisa científica sobre a ocorrência de bactérias que causam infecções hospitalares e que são resistentes a muitos antibióticos. Neste sentido, solicito sua colaboração na participação da pesquisa, aceitando participar da coleta.

Os dados serão apresentados na Universidade Federal do Ceará - Sobral e divulgados junto à comunidade acadêmica, respeitando o caráter confidencial das identidades. Garanto-lhe que sua participação ficará no anonimato, não será divulgado seu nome. Pretendemos com esta pesquisa verificar a sensibilidade a antibióticos de bactérias que causam infecções em pessoas hospitalizadas.

Você tem o direito de não participar dessa pesquisa se assim o desejar, mas seria importante sua participação. Aceitando participar, se por qualquer motivo, durante o andamento da pesquisa, resolver desistir, tem toda liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento. Reforço que sua colaboração e participação poderão trazer benefícios para o desenvolvimento científico. Participar da coleta não lhe trará riscos para sua saúde, nem mesmo risco de receber advertência por ter participado ou não. Ressalto que não será realizada coleta adicional de sangue ou qualquer outra amostra biológica, ou seja, o isolamento bacteriano será realizado a partir da amostra solicitada e já coletada pela equipe médica do hospital de ensino. Tudo ocorrerá em sigilo. Além disto, será verificada a resistência dessas bactérias a antibióticos, esses dados serão comunicados à equipe médica e poderão auxiliar no seu tratamento.

Para possíveis esclarecimentos entrar em contato comigo no endereço: Avenida Comandante Maurocélio Rocha Pontes, 100 - Derby - 62042-280 – Sobral – CE, telefone (88) 3611.8000 Ramal 231 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da UVA, Avenida Comandante Maurocélio Rocha Pontes, 150 - Derby - 62042-280- Sobral – CE, telefone (88) 3677-4255.

Atenciosamente,

Izabelly Linhares P. Brito

Izabelly Linhares Ponte Brito
Farmacêutica bioquímica
Santa Casa de Misericórdia de Sobral

Consentimento Pós-Informado

Declaro que tomei conhecimento do estudo que pretende avaliar a ocorrência de bactérias que causam infecções hospitalares e a suscetibilidade dessas bactérias a diferentes antibióticos cujo título é "**Investigação da diversidade genômica de isolados nosocomiais de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes produtores de carbapenemases**", realizado pela pesquisadora Izabelly Linhares Ponte Brito, compreendi seus propósitos e, concordo em participar da pesquisa, não me oponho à coleta da amostra biológica, e também sei que em qualquer momento posso retirar meu consentimento em participar da mesma.

Sobral, _____ de _____ de 2016.

Ciente: _____
Assinatura do Sujeito, responsável ou testemunha

_____
Assinatura do Pesquisador

SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SOBRAL

SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SOBRAL
DEPARTAMENTO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO
SUBCOMISSÃO DE PESQUISA

Sobral-CE, 16 de junho de 2016.

CARTA DE ANUÊNCIA PARA COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumanii* MULTIRRESISTENTES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES"**, sob responsabilidade do Orientador,Prof.Francisco César Barroso Barbosa; obedece ao protocolo para realização de pesquisa desta instituição, obtendo **Parecer Favorável** desta subcomissão para sua realização. A pesquisa foi submetida ao DEPE (Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão) no mês de junho/2016 e terá como campo de coleta de dados a Santa Casa de Misericórdia de Sobral, durante os meses descritos no cronograma em anexo.

Atenciosamente,

Vicente de Paulo Teixeira Pinto
Diretor do DEPE

Prof. Dr. Vicente de Paulo T. Pinto
Diretor do Departamento de
Ensino, Pesq. e Extensão.
Santa Casa de M. de Sobral

Scanned by CamScanner

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a Farmacêutica e estudante de mestrado em Ciência da Saúde pela Universidade Federal do Ceará Izabelly Linhares Ponte Brito a ter acesso às amostras biológicas do setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Geralde Fortaleza - HGF, para realização de sua dissertação de mestrado, cuja pesquisa é assim intitulada "INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES"

Antônio Rhandel

Coordenador do Laboratório de Análises Clínicas

Hospital Geral de Fortaleza - HGF

Scanned by CamScanner

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a Farmacêutica e estudante de mestrado em Ciência da Saúde pela Universidade Federal do Ceará Izabelly Linhares Ponte Brito a ter acesso às amostras biológicas do setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Geral Cesar Calls, para realização de sua dissertação de mestrado, cuja pesquisa é assim intitulada "INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES"

Daniel Soares do Nascimento
Biomedico Citologista - CRB-2159
CHEFE DO CENTRO

Daniel Soares Nascimento
Coordenador do Laboratório de Análises Clínicas
Hospital Geral Cesar Calls

Scanned by CamScanner

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a Farmacêutica e estudante de mestrado em Ciência da Saúde pela Universidade Federal do Ceará Izabelly Linhares Ponte Brito a ter acesso às amostras biológicas do setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitario Walter Cantidio, para realização de sua dissertação de mestrado, cuja pesquisa é assim intitulada "INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES"

José Nilson Ferreira Gomes Neto
Chefe do Lab. de Análises Clínicas/HUWC
CRF: 2536 SIAPE: 16560493

Jose Nilson Ferreira Gomes Neto

Coordenador do Laboratório de Análises Clínicas

Hospital Universitario Walter Contidio

Scanned by CamScanner

UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ - UVA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE Acinetobacter baumannii MULTIRRESISTENTES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES

Pesquisador: Izabelly Linhares Ponte Brito

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57095216.0.0000.5053

Instituição Proponente: Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Patrocinador Principal: Santa Casa de Misericórdia de Sobral

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.843.504

Apresentação do Projeto:

. Coleta de dados: De Novembro de 2016 a Abril de 2017, serão coletadas espécies nosocomiais de A. baumannii isolados de amostras clínicas de sangue, de infecções do trato respiratório, ponta de cateter percutâneo, secreção de abscesso e de ferida cirúrgica. Vale ressaltar, que o isolamento das espécies bacterianas será realizado a partir de amostras clínicas de pacientes internados em enfermarias e Unidades de Terapia Intensiva com suspeita de infecção hospitalar, desde que essas amostras já tenham sido previamente solicitadas e coletadas pela equipe médica dos hospitais de ensino envolvidos nesta pesquisa. Portanto, não será feita coleta adicional de sangue e nem de nenhuma outra amostra clínica do paciente. Dessa forma, a quantidade e manipulação das amostras segue o protocolo operacional padrão de cada hospital, assim

como o método de descarte das amostras biológicas segue o plano de gerenciamento de resíduos de serviço de saúde de acordo com a Resolução RDC Nº306 de 07 de dezembro de 2004. Todos os isolados serão previamente identificados no laboratório de microbiologia dos referidos hospitais

pelo sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Após, os espécimes serão armazenados e enviados em tubos contendo

BHI (Brain Heart Infusion) (Himedia ®, Mumbai, Índia) com glicerol a 20% ao Laboratório de

Endereço: Av Comandante Maurocélio Rocha Ponte, 150
Bairro: Derby **CEP:** 62.041-040
UF: CE **Município:** SOBRAL
Telefone: (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva_comitedeetica@hotmail.com