



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**ESCOLA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANA PAULA DE ANDRADE LOPES**

**DETECÇÃO DO GENE *qacEΔ1* E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO  
CLORETO DE BENZALCÔNIO EM ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* DE  
AMBIENTE HOSPITALAR E DE AMOSTRAS CLÍNICAS**

**CURITIBA**

**2020**

**ANA PAULA DE ANDRADE LOPES**

**DETECÇÃO DO GENE *qacEΔ1* E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO  
CLORETO DE BENZALCÔNIO EM ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* NO  
AMBIENTE HOSPITALAR E EM AMOSTRAS CLÍNICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito para obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

**Co orientadora:** MSc. Lavinia Nery Villa Stangler Arend

**CURITIBA**

**2020**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Edilene de Oliveira dos Santos CRB-9/1636

Lopes, Ana Paula de Andrade

L864d  
2020 Detecção do gene *qacEΔ1* e a concentração inibitória mínima do cloreto de benzalcônio em isolados de *Acinetobacter baumannii* no ambiente hospitalar e em amostras clínicas / Ana Paula de Andrade Lopes; orientador, Felipe Francisco Bondan Tuon; coorientador, Lavinia Nery Villa Strangler Arend. -- 2020  
70 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2020.

Bibliografia: f. 61-70

1. Ciências da saúde. 2. *Acinetobacter baumannii*. 3. Benzalcônio. 4. Desinfetantes. 5. Serviço hospitalar de limpeza. 6. Resistência microbiana a medicamentos. I. Tuon, Felipe Francisco Bondan. II. Arend, Lavinia Nery Villa Strangler. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título

CD D. 20.ed. – 610



**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos 24 dias do mês de fevereiro de 2021 às 15:00, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação "DETECÇÃO DO GENE *qacEΔ1* E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO CLORETO DE BENZALCÔNIO EM ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* DE AMBIENTE HOSPITALAR E DE AMOSTRAS CLÍNICAS" apresentado por Ana Paula de Andrade Lopes para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

<b>MEMBROS DA BANCA</b>	<b>ASSINATURA</b>
<b>Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon – Presidente</b>	
<b>Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki (UFRGS)</b>	
<b>Profa. Dra. Keite Da Silva Nogueira (UFPR)</b>	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

**Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon**

**Conceito: APROVADA**

**Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki**

**Conceito: APROVADA**

**Profa. Dra. Keite Da Silva Nogueira**

**Conceito: APROVADA**

**Parecer Final: APROVADA**

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon  
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena  
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

*“Antibiotic are truly miracle drugs that have saved countless millions of lives.  
But antibiotic resistance is a critical public health issue that is eroding the effectiveness of  
antibiotics and may affect the health of each and every one of us.”*

*Betsy Bauman*

## AGRADECIMENTOS

Obrigada a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Muito obrigada a vocês que enriqueceram a minha mente, que me incentivaram, acreditaram em mim, por todo amor, carinho e compreensão que vocês me proporcionaram, em especial a minha família.

À PUCPR, ao PPGCS e CNPq, pela oportunidade de estudo e concessão de taxa.

Ao meu orientador, Dr. Felipe Tuon, pela paciência e generosidade, por acreditar em mim, me conceder diversas oportunidades e todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável. Sem sua orientação e apoio nada disso teria sido possível.

À minha coorientadora, MSc. Lavinia Nery Villa Stangler Arend, por dividir seu incrível e extenso conhecimento, e auxílio no desenvolvimento técnico do trabalho, cujos esforços tornaram possível a concretização deste projeto, e auxílio na realização desse nas dependências do LACEN e setor de Bacteriologia.

À minha amiga Victoria Stadler Tasca Ribeiro, pelo apoio, amizade e paciência, pelo auxílio na revisão e desenvolvimento deste trabalho, por sempre ser solícita e estar de prontidão para auxílio nas dificuldades.

Aos meus amigos do LEID – Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Letícia Kraft, Juliette Cieslinski Carmen Ito, Larissa Bail, Keite Nogueira, Paula Hansen Suss, companheiros de pesquisa, experimentos, discussões, aulas e aprendizados.

À Equipe do Laboratório Central do Estado - LACEN, pela valiosa ajuda e paciência, cordialidade e disposição na realização desse trabalho.

À banca examinadora por aceitar o convite e pela sua valiosa avaliação.

Agradeço a Deus, por estar sempre comigo, me guiando e abençoando cada passo nesta caminhada. Por me conceder saúde e sabedoria para seguir sempre em frente, sendo a minha força e o meu guia em todos os momentos.

“Por mais inteligente que alguém possa ser,  
se não for humilde, o seu melhor se perde na arrogância.  
A humildade ainda é a parte mais bela da sabedoria.”  
(Nelson Swel)

## RESUMO

**Introdução:** O *Acinetobacter* é um coco-bacilo gram-negativo, não fermentador de glicose, aeróbio e imóvel. A frequência de *Acinetobacter baumannii* resistente à carbapenêmicos (CRAB) vem sendo descrita ao longo dos anos. Sendo muito preocupante o tratamento das infecções relacionadas aos serviços de saúde (IRAS). No Brasil, a infecção por CRAB vem sendo relatada desde os anos 90, e no Paraná desde 2003. O uso empírico de polimixina, colistina e doxiciclina, utilizados com muita frequência tem sido um aliado no tratamento destas infecções. As carbapenemases mais difundidas em *A. baumannii* são as  $\beta$ -lactamases da classe D, codificadas pelo gene *bla<sub>OXA-23</sub>*. A sobrevivência e propagação de CRAB no ambiente hospitalar é uma preocupação constante. Os compostos quaternários de amônio, como o cloreto de benzalcônio (BZK), estão entre os biocidas mais comumente usados no âmbito hospitalar e são considerados agentes não específicos reativos à membrana. Uma das preocupações é a possível resistência aos agentes usados na limpeza de superfícies hospitalares. A resistência aos biocidas frequentemente é mediada pela aquisição ou hiper expressão de bombas de efluxo multidrogas, por exemplo, o gene *qacEΔ1*. **Objetivos:** o objetivo deste estudo foi determinar a concentração inibitória mínima do cloreto de benzalcônio (BZK) em *Acinetobacter baumannii*, bem como a caracterização molecular e clonal destes isolados, e pesquisa do gene *qacEΔ1*. **Métodos:** Cinquenta isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (CRAB) de amostras clínicas e ambiente nosocomial foram avaliados. A similaridade genética foi avaliada com *Matrix assisted laser desorption ionization time of flight* (MALDI-TOF) usando a ferramenta de taxonomia do software Saramis e pelo sistema rep-PCR Diversilab. O gene *bla<sub>OXA51</sub>*, o gene *bla<sub>OXA23</sub>* e o gene *qacEΔ1* foram pesquisados usando qPCR. O teste de susceptibilidade antimicrobiana a amicacina, gentamicina, ciprofloxacino, colistina, imipenem, meropenem, cefepima, ceftazidima, piperaciclina/tazobactam, doxiciclina e polimixina B; e cloreto de benzalcônio foram realizados por microdiluição em caldo. **Resultados:** os perfis de pico do MALDI-TOF identificaram três grupos diferentes de CRAB e o *bla<sub>OXA23</sub>* foi amplificado em todos os isolados. O gene *qacEΔ1* foi amplificado em 47 amostras (94%). A suscetibilidade a colistina, polimixina e doxiciclina foi de 100%, com MIC<sub>50-90</sub> respectivo = 0,5-1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , 0,25-0,5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  e 1-2  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . A suscetibilidade ao BZK mostrou que 70% dos isolados tinham CIM igual a 16  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . **Conclusão:** Nosso estudo mostrou pelo MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> dos antimicrobianos polimixina, colistina e doxiciclina, nos fornecem opções terapêuticas clínicas e microbiológicas eficazes. A similaridade clonal destes isolados deve ser estudada para avaliação de sua disseminação nosocomial, e podem ser avaliados pelo software Saramis. O gene *qacEΔ1* foi altamente prevalente em três grupos de *Acinetobacter*, e esta ligado a concentrações elevadas de BZK suficientes para inibir seu crescimento. Sugerindo que a desinfecção insuficiente das superfícies pode levar à seleção de patógenos resistentes no ambiente hospitalar.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Acinetobacter baumannii*; benzalcônio; desinfetante; ambiental; resistência.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Acinetobacter* is a non-glucose-fermenting Gram negative aerobic immobile coco-bacillus. The frequency of Carbapenems resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) has been described over the years. The treatment for these increasingly scarce infections related to health services (IRAS) is of great concern. It has been reported in Brazil since the 1990s, and in Paraná state, since 2003. The empirical use of polymyxin, colistin and doxycycline has been used very frequently and has been an ally in the treatment of these infections. The most widespread carbapenemases in *A. baumannii*, the  $\beta$ -lactamases of class D, *bla*<sub>OXA-23</sub>. The survival and spread of CRAB in the hospital environment is a constant concern. Quaternary ammonium compounds, such as benzalkonium chloride (BZK), are among the most commonly used biocides in the hospital environment and are considered non-specific membrane reactive agents. One concern is the possible resistance to agents used in cleaning hospital surfaces. Resistance to biocides is often mediated by the acquisition or hyper-expression of multi-drug efflux pumps, e.g. the gene *qacEΔ1*. **Objectives:** The aim of this study was to determine the minimal inhibitory concentration of the BZK in *Acinetobacter baumannii*, as well as molecular and clonal characterization of *qacEΔ1* gene. **Methods:** Fifty Carbapenem-resistant CRAB isolates from clinical samples and the nosocomial environment were evaluated. Genetic similarity was evaluated with *Matrix assisted laser desorption ionization time of flight* (MALDI-TOF) using the taxonomy tool of the Saramis software and by rep-PCR Diversilab system. Genes *bla*<sub>OXA51</sub>, *bla*<sub>OXA23</sub>, and *qacEΔ1* were study using qPCR. The antimicrobial susceptibility assay to ampicillin, gentamicin, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, cefepim, ceftazidime, piperacilina/tazobactam, of polymyxin, colistin and doxycycline and benzalkonium chloride was performed by broth microdilution. **Results:** The MALDI-TOF peak profiles identified three different CRAB clusters and *bla*<sub>OXA-23</sub> were amplified in all isolates. The *QacEΔ1* gene was amplified in 47 samples (94%). Colistin, polymyxin and doxycycline susceptibility was 100%, with respective MIC<sub>50-90</sub> = 0.5-1  $\mu$ g/mL, 0.25-0.5  $\mu$ g/mL, and 1-2  $\mu$ g/mL. The BZK susceptibility showed that 70% of the isolates had MIC equal to 16 $\mu$ g/mL. **Conclusion:** Our study showed that MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> antimicrobials polymyxin, colistin and doxycycline provide us with effective clinical and microbiological therapeutic options. The clonal similarity of these isolates should be studied to evaluate their nosocomial dissemination, and they can be evaluated by Saramis software. The *qacEΔ1* gene was highly prevalent in three groups of *Acinetobacter*, and is linked to high concentrations of BZK sufficient to inhibit its growth. This study suggests that insufficient disinfection of surfaces may lead to the selection of resistant pathogens in the hospital environment.

**KEYWORDS:** *Acinetobacter baumannii*; benzalkonium; disinfectant; environment; resistance.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação do micro-organismo *Acinetobacter baumannii*. A) Coloração de Gram; B) Crescimento em ágar macConkey.

**Figura 2.** Porcentagem de fenótipos de resistência entre os bacilos gram-negativos mais frequentemente notificados como agentes etiológicos de IPCSL associada a CVC em pacientes hospitalizados em UTI adulto e pediátrica. Fonte: GVIMS/GGTES/ANVISA, 2017

**Figura 3:** Principais Microorganismos reportados em IRAS, no período de janeiro a Junho de 2019. Legenda: (PNEU) Pneumonia; (ITU) Infecção do Trato Urinário; (ISC) Infecção do Sítio Cirúrgico; (IPCSL) Infecção Primária de Corrente Sanguínea Laboratorialmente confirmada. Fonte: SESA/SVS/CEVS, 2019.

**Figura 4.** Perfil de Sensibilidade/Resistência do *Acinetobacter baumannii* notificado em IRAS nas principais topografias em 2019. Legenda: (IPCSL) Infecção Primária de Corrente Sanguínea Laboratorialmente Confirmada; (ISC) Infecção de Sítio Cirúrgico; (ITU) Infecção do Trato Urinário; (PNEU) Pneumonia; (S) Sensível; (R) Resistente; (MPN) Meropenem; (IPN) Imipenem. Fonte: SESA/SVS/CEVS, 2019.

**Figura 5.** Representação dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos pelo *Acinetobacter baumannii*. Legenda: uma membrana externa e uma membrana citoplasmática, entre as quais (o espaço periplasmático)  $\beta$ -lactamases (carbapenemases, AmpC  $\beta$ -lactamases e  $\beta$ -lactamases de espectro estendido) residem. As proteínas de ligação à penicilina (PBPs), localizadas na membrana citoplasmática. Fonte: MUNOZ, 2008.

**Figura 6.** Distribuição geográfica dos clones detectados em diferentes estados brasileiros. pelo *Acinetobacter baumannii*. Legenda: AL, Alagoas; AM, Amazonas; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; SC, Santa Catarina. Fonte: (CHAGAS, 2014).

**Figura 7.** Mecanismo de ação do biocida Cloreto de Benzalcônio – BZK na parede do micro-organismo. A: BZK em primeiro contato com a parede, adentrando na membrana citoplasmática. B: Formação de micelas entre o BZK e os fosfolípidos, resultando em desestruturação da parede celular. Fonte: o autor, adaptado de Gilbert, et al; 2005.

**Figura 8.** Mecanismos de resistência ao agente biocida: impermeabilidade da membrana; mudança da composição da membrana; degradação enzimática; mudança do sítio ativo e ação das bombas de efluxo. Fonte: Wand, 2017.

**Figura 9:** Dendograma descrevendo porcentagem de similaridade, bandas e análise hierárquica de clusters de isolados de *Acinetobacter baumannii* através de MALDI-TOF MS (A) e rep-PCR (B).

**Figura 10:** Representação das imagens em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR em tempo real para pesquisa do gene *qacE $\Delta$ 1*. A: Representa resultados do AB01 à AB47; B: representa resultados do AB48 à AB62.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Descrição dos respectivos pares de oligonucleotídeos e respectivas probes (Invitrogen Brasil Ltda).

**Tabela 2:** Características clínicas dos pacientes com infecções por *Acinetobacter baumannii*.

**Tabela 3:** Presença dos genes de resistência testados em isolados de *Acinetobacter baumannii*.

**Tabela 4:** Sítios de Infecção e concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos/biocidas testados em isolados de *Acinetobacter baumannii*. R (resistente), I (Intermediário) or S (sensível) de acordo com o critério de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). A AMK, amikacin; CST, colistina; CFZ, ceftazidime; CEP, cefepime; CIP, ciprofloxacina; DOX, doxycycline; GEN, gentamicina; MEM, meropenem; IPM, imipenem; POL, polymyxin B; PPT, piperacilin/tazobactam; BZK; benzalkonium chloride.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	Cefalosporinase derivada de <i>Acinetobacter</i>
AMK	Amicacina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BZK	Cloreto de benzalcônio
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças ( <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> )
CGLAB	Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública
CIM	Concentração inibitória mínima (MIC- Minimum inhibitory concentration)
CEP	Cefepime
CFZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRAB	Carbapenemase resistance <i>Acinetobacter baumannii</i>
CST	Colistina
CT	Cycle Threshold
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
DOX	Doxyciclina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético ( <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
EPIC II	<i>Extended prevalence of infection in intensive care II</i>
ESBL	$\beta$ -lactamases de espectro estendido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GEN	Gentamicina
HUC	Hospital Universitário Cajuru
IQR	Intervalo interquartil
IMP	<i>Imipenem hydrolyzing b-lactamase</i>
IPCSL	Infecção Primária de Corrente Sanguínea

IRAS	Infecções relacionadas à assistência em saúde
ISC	Infecção de sítio cirurgico
ITU	Infecção do trato urinário
KPC	Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase
LACEN-PR	Laboratório Central do Estado do Paraná
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>
MBL	Metallo- $\beta$ -lactamases
MEM	Meropenem
NDM	New Delhi metallo-beta-lactamase
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
NHSN	<i>US National Healthcare Safety Network</i>
OmpA	Proteína da membrana externa A
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OXA	Oxacillinase (class D Ambler).
PBP	Proteínas de ligação à penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico
PNEU	Pneumonias
PNPCIRAS	Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
POL	Polymixina B
PPT	Piperacilina / Tazobactam
RNA	Ácido Ribonucleico ( <i>Ribonucleic acid</i> )
RM	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
SESA	Secretaria Estadual de Saúde do Paraná
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UTI	Unidade de terapia Intensiva

VIM	Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamases
WHO	Organização Mundial da Saúde ( <i>World Health Organization</i> )
XDR	Resistência a extensas Drogas

## Sumário

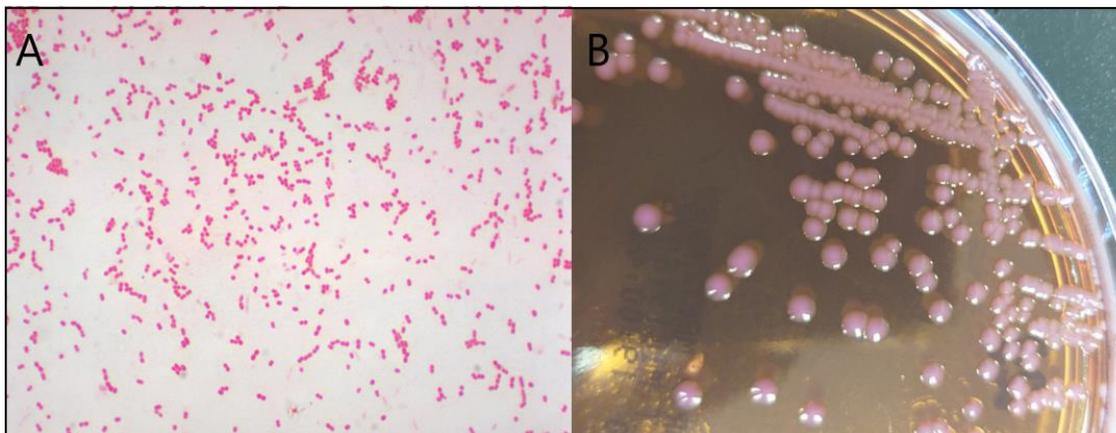
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Gênero Acinetobacter</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Contextualização Epidemiológica</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Opções de Tratamento Antimicrobiano</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos</b>	<b>25</b>
1.4.1 Enzimas Inativadoras de Antimicrobianos	26
1.4.2 Acesso Reduzido a Alvos Bacterianos	29
1.4.3 Alteração na afinidade ou superexpressão nas proteínas de ligação à penicilina (PBPs)	31
<b>1.5 Agentes Biocidas</b>	<b>31</b>
1.5.1 Cloreto de benzalcônio – BZK	33
1.5.2 Mecanismos de Resistência ao BZK	36
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>39</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>41</b>
3.1. Objetivos Específicos	41
<b>4. MÉTODOS</b>	<b>42</b>
4.1. Isolamento das Amostras	42
4.2. Similaridade Genética das cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	43
4.3. Verificação da Presença do gene <i>bla<sub>OXA51</sub></i> , gene <i>bla<sub>OXA23</sub></i> e gene <i>qacEΔ1</i>	45
4.4. Ensaio de Suscetibilidade à Antimicrobianos	46
4.5. Ensaio de Suscetibilidade ao Cloreto de Benzalcônio	46
4.6. Análise Estatística	47
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>48</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>60</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>63</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Gênero *Acinetobacter*

O *Acinetobacter* é um coco-bacilo Gram-negativo, não fermentador de glicose, aeróbio e imóvel. Este gênero foi descrito pela primeira vez em 1911 como *Micrococcus calcoaceticus* quando isolado do solo por Beijerinck (ALMASAUDI, 2018). Ao passar dos anos, possuiu uma longa histórica de mudança taxonômica, quando em 1954 foi proposta a mudança para *Acinetobacter*, derivado do latim imóvel (MUNOZ, 2008; PELEG, 2008). Hoje este gênero é pertencente à família *Moraxellaceae* (FOURNIER, 2006). Atualmente, o gênero *Acinetobacter* é composto por 73 espécies, sendo 63 reconhecidos oficialmente (<https://lpsn.dsmz.de/genus/acinetobacter>. Acesso em 26/05/2020).

Uma das espécies mais importantes e endêmicas deste grupo é o *Acinetobacter baumannii* (figura 1). Sendo um dos principais agentes oportunistas causadores de infecções hospitalares, como bacteremia, infecção no trato urinário, infecção de sítio cirúrgico, e pneumonia associada à ventilação mecânica, estando associado à alta mortalidade quando é etiologia de infecções graves (ALMASAUDI, 2018; DIJKSHOORN, 2007; ZARRILLI, 2007).



**Figura 1.** Representação do micro-organismo *Acinetobacter baumannii*. A) Coloração de Gram (objetiva de 100x); B) Crescimento em ágar MacConkey. Fonte: o autor, 2020.

As bactérias do gênero *Acinetobacter* apresentam uma maior sobrevivência em superfícies inanimadas que outros microrganismos, correspondendo a uma combinação de produção de bacteriocinas, a presença de uma cápsula, formação de biofilme, entre outros; ocasionando uma maior viabilidade sob condições secas (ENOCH, 2007; JAWAD, 1996). A produção de biofilme fenotipicamente está associada com a produção de exopolissacarídeos e formação de *pilus* (TOMARAS, 2003). Em um estudo de revisão sistemática concluiu-se que o *A. baumannii* pode alcançar uma sobrevivência de 3 dias até 5 meses em superfícies, alavancando a importância da desinfecção correta de superfícies e objetos na prevenção e controle da disseminação microbiana, assim como a escolha correta do biocida para diminuir os riscos de infecções cruzadas durante a permanência hospitalar (KRAMER, 2006).

## 1.2 Contextualização Epidemiológica

Segundo o Ministério da Saúde, Portaria nº 2616 de 13 de maio de 1998, infecção hospitalar é definida como:

*“... aquela adquirida após a internação do paciente e que se manifesta durante a internação ou mesmo após a alta quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares.”*

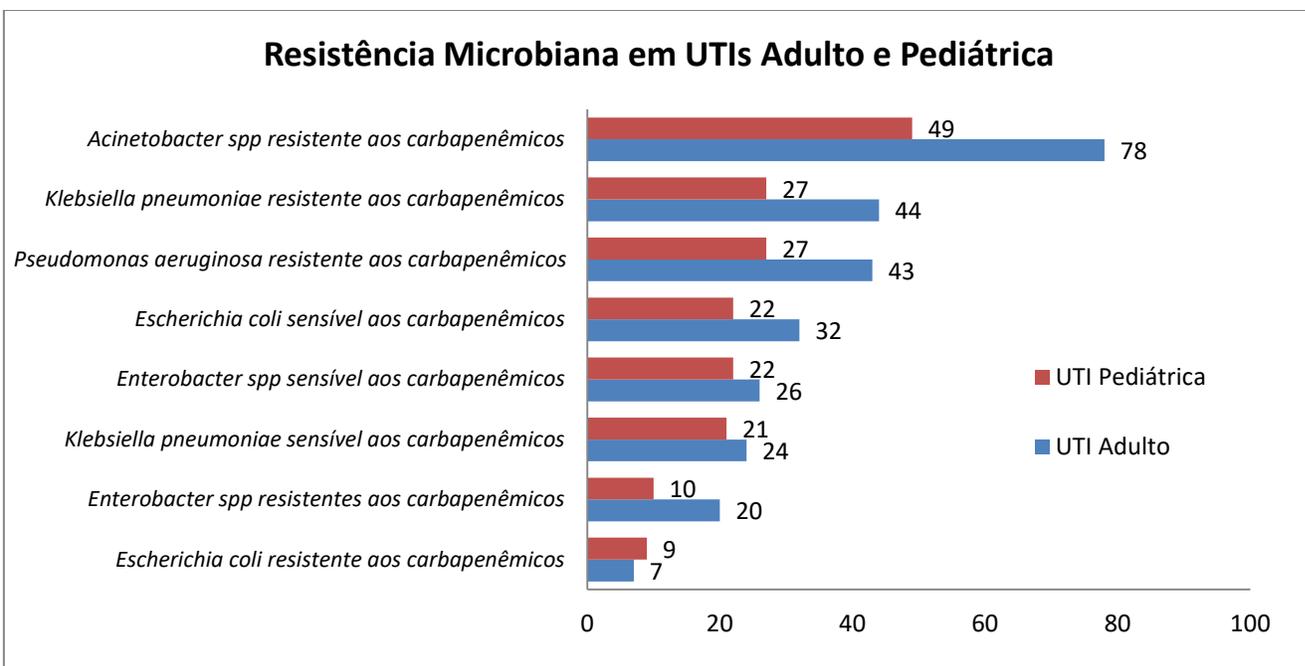
Na década de 90, a terminologia infecção hospitalar foi substituído por “infecções relacionadas à assistência em saúde” – IRAS, integrando as infecções adquiridas à assistência em qualquer ambiente. Apresentando impacto sobre a letalidade hospitalar, duração da internação e seus custos (HORAN, 2008).

As infecções adquiridas no hospital ocasionadas pelo *Acinetobacter baumannii*, foram descritas inicialmente nos anos 60 e 70. Inicialmente infecções leves, contudo ao passar do tempo coincidentemente com o aumento na utilização de UTIs, ventilação mecânica, cateterização venosa em conjunto com as diversas terapias antimicrobianas; verificou-se um aumento na gravidade e frequência destas infecções (WONG, 2017). Pacientes imunocomprometidos, doenças pré-existentes, ou procedimentos invasivos favorecem a ocorrência de IRAS (PEREIRA, 2005). A gravidade destas infecções pode ser exemplificada também pelo aumento gradual de resistência aos antimicrobianos e agentes biocidas.

Atualmente observa-se uma grande preocupação ao redor do mundo quanto ao seu difícil manejo clínico. O NHSN – US National Healthcare Safety Network (CDC), constatou nos anos de 2009-2010 que 1,8% de todas as infecções adquiridas foram ocasionadas pelo *A. baumannii*. Dentre destes isolados 50% são resistentes a carbapenêmicos, nos Estados Unidos, e esta incidência é ainda maior no leste e sul da Europa, América Latina e países asiáticos (WONG, 2017). Corroborando com dados obtidos do NNIS - National Nosocomial Infections

Surveillance, uma análise comparativa entre os anos de 1975 e 2003, mostrou que já estava ocorrendo um aumento significativo nas infecções ocasionadas por este patógeno também nos hospitais americanos, evidenciando um aumento de 1,5% para 6,9% das pneumonias, 0,5% para 2,1% das infecções de sítio cirúrgico por este patógeno (SLAMA, 2008). Em um estudo em hospitais brasileiros entre os anos de 2003 a 2008, pelo programa SENTRY, observou-se que o *Acinetobacter* era responsável por 8% das septicemias (ANDRADE, 2008).

No Brasil, o “Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde” (PNPCIRAS), criado desde 2010, disponibiliza dados de incidência das IRAS em serviços de saúde. O último boletim epidemiológico nos traz dados concisos da frequência de IRAS ocasionadas *Acinetobacter sp.* nacionalmente (figura 2). Em 2017, 78% dos isolados apresentaram perfil de resistência e 49% de incidência respectivamente em UTIs adulto e UTIs pediátricas, quanto a infecções de corrente sanguínea (IPCSL) associada a cateteres venosos (GVIMS/GGTES/ANVISA, 2017).

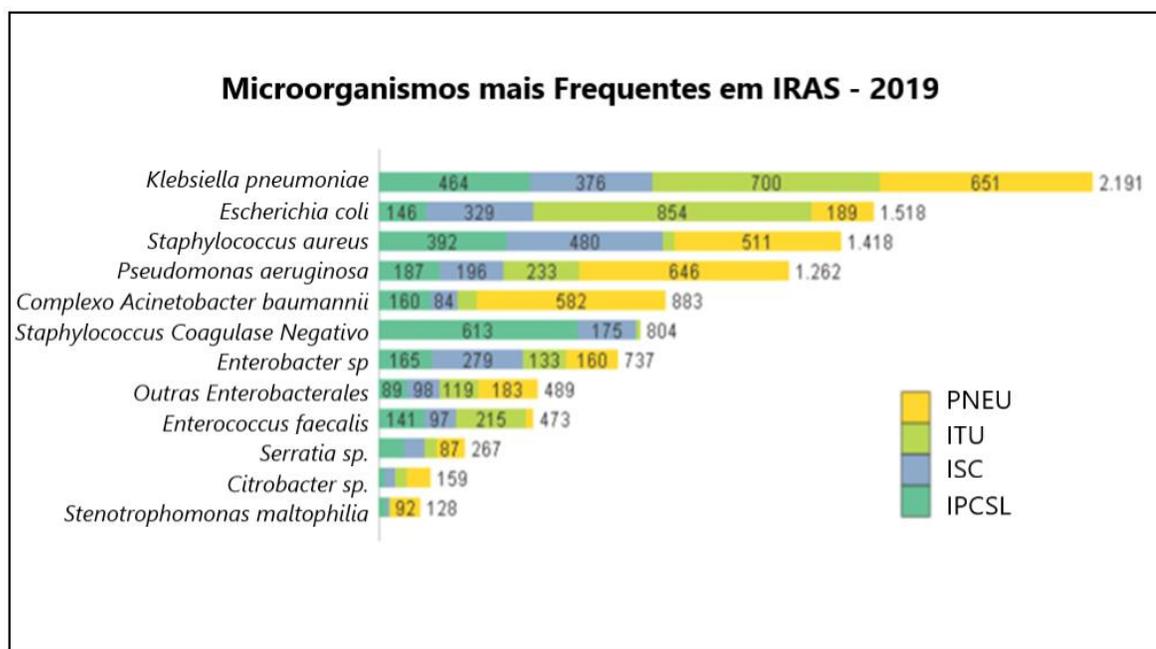


**Figura 2.** Porcentagem de fenótipos de resistência entre os bacilos gram-negativos mais frequentemente notificados como agentes etiológicos de IPCSL associado a cateteres venosos em pacientes hospitalizados em UTI adulto e pediátrica. Fonte: GVIMS/GGTES/ANVISA, 2017.

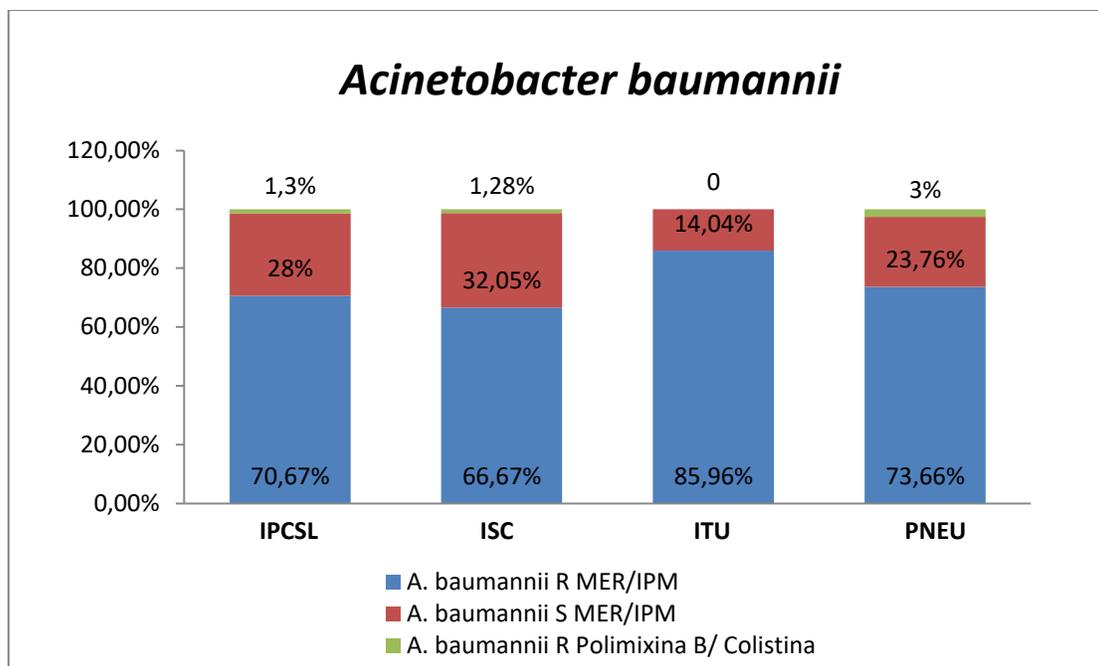
Em 2017 a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná publicou a Resolução SESA/PR n° 188/2017, que tornou o Sistema SONIH como ferramenta obrigatória para notificação dos indicadores epidemiológicos de IRAS no Paraná. Podemos visualizar na figura 3, que o *Acinetobacter baumannii complex*, está em 5° lugar em frequência de causador de IRAS no ano de 2019, em um total de 883 casos 66% foram pneumonias, 18 % infecções de corrente sanguínea, 9,5% infecções do sítio cirúrgico, 6,5% infecções no trato urinário (SESA/SVS/CEVS, 2019).

A frequência de *Acinetobacter baumannii* resistente à carbapenêmicos (CRAB) vem sendo descrita ao longo dos anos. Sendo muito preocupante a forma de tratamento para estas IRAS, cada vez mais escassa. No Brasil vem sendo relatada desde os anos 90, e no Paraná desde 2003. Corroborando com dados obtidos pela SESA no ano de 2019 (figura 4), acima de 60% de prevalência da multirresistência aos carbapenêmicos nas IRAS ocasionadas pelo

*Acinetobacter baumannii*, encontrada em 85,96% em infecções no trato urinário, 73,66% em pneumonias.



**Figura 3:** Principais Microorganismos reportados em IRAS, no período de janeiro a Junho de 2019. Legenda: (PNEU) Pneumonia; (ITU) Infecção do Trato Urinário; (ISC) Infecção do Sítio Cirúrgico; (IPCSL) Infecção Primária de Corrente Sanguínea Laboratorialmente confirmada. Fonte: SESA/SVS/CEVS, 2019.



**Figura 4.** Perfil de Sensibilidade/Resistência do *Acinetobacter baumannii* notificado em IRAS nas principais topografias em 2019. Legenda: (IPCSL) Infecção Primária de Corrente Sanguínea Laboratorialmente Confirmada; (ISC) Infecção de Sítio Cirúrgico; (ITU) Infecção do Trato Urinário; (PNEU) Pneumonia; (S) Sensível; (R) Resistente; (MPN) Meropenem; (IPN) Imipenem. Fonte: SESA/SVS/CEVS, 2019.

A investigação epidemiológica é de grande valia quando identificado um surto relacionado às infecções hospitalares, principalmente ao combate de emergentes patógenos multirresistentes e realização de adequados bloqueios de propagação dentro da unidade hospitalar. Geralmente desencadeadas por um aumento na prevalência de infecção associada a um patógeno específico, a um grupo de pacientes infectados ou à identificação de um isolado que possui um padrão distinto de suscetibilidade antimicrobiana (SINGH, 2006).

A ocorrência da resistência aos antimicrobianos e aos agentes biocidas é um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Com isso deve-se levar em consideração a necessidade de desenvolvimento e aquisição de recursos que viabilizam uma política segura à atenção ao paciente. Exemplificados por investimentos em pesquisa, estudos clínicos, controle e prevenção das IRAS, programas de *stewardship* para racionalização do uso de

antimicrobianos com o intuito de evitar o uso indiscriminado e a resistência adquirida pelo uso inadequado, intervenções na desinfecção correta de superfícies, entre outros.

### **1.3 Opções de Tratamento Antimicrobiano**

Atualmente, existem poucas opções terapêuticas para o tratamento de patógenos multirresistentes. Comumente em infecções ocasionadas por *Acinetobacter baumannii*, a classe dos carbapenêmicos é utilizada como tratamento de escolha, quando ainda há presença de suscetibilidade a estes.

O meropenem e o imipenem foram introduzidos ao combate desse micro-organismo em 1985, e por anos tem sido o maior aliado ao tratamento das infecções (DIJKSHOORN, 2007). No entanto, seu uso indiscriminado levou à indução de resistência a estes antimicrobianos. Seu mecanismo de ação é a interferência com a síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana, se conectando as PBPs inibindo a enzima de transpeptidação responsável pela ligação cruzada das cadeias peptídicas conectadas ao esqueleto do peptidoglicano (HANG, 2007).

Quando as cepas encontradas são resistentes aos carbapenêmicos, o tratamento empírico de polimixina, colistina e doxiciclina, têm sido utilizados com muita frequência e tem sido um aliado no tratamento destas bacteremias. A polimixina foi utilizada até a década de 80 para tratamento de infecções ocasionadas por bacilos Gram-negativos, e havia sido descontinuado seu uso devido a sua toxicidade (CARVALHO, 2009). Contudo vem sendo a maior aliada e mais importante agente no tratamento das infecções ocasionadas pelo CRAB no âmbito hospitalar.

A polimixina B e a colistina são polipeptídios catiônicos e tem como função interagir com a camada lipopolissacarídea. São drogas de efetividade clínica para o tratamento de pneumonias, e meningite bacterianas (KARAGEORGOPOULOS, 2008). A colistina é encontrada em duas formas, como sulfato de colistina e colistimetato de sódio, esta última é uma forma inativa que necessita sofrer uma hidrólise para obtenção da forma ativa, muito usada em administrações parenterais devido a uma menor toxicidade. Contudo alguns estudos relatam possibilidade de concentrações mínimas plasmáticas reduzidas levando um aumento na mortalidade. Com isso quando utilizada deve se levar em consideração fatores como sítio alvo da infecção, MIC encontrado no teste in vitro, e o estado clínico do paciente, para a obtenção de um correto manejo terapêutico específico para o paciente. Estudos apresentaram que a taxa de sobrevida pode variar de 25-75% (GARNACHO-MONTERO, 2015; KARAGEORGOPOULOS, 2008). No entanto o uso empírico destas drogas deve ser feito com cautela, devido à presença de efeitos adversos de nefrotoxicidade e neurológicos ocasionados nos pacientes (TUON, 2011).

A terapia combinada pode ser um dos recursos para obtenção de sucesso no tratamento terapêutico destas infecções. Muitas vezes elas podem ser aliadas alcançando taxas mais altas de sobrevida, diminuem prazo e dose do medicamento e conseqüentemente diminuindo o risco de indução a resistência a esta droga se utilizada como monoterapia. Em um estudo comparou-se a associação de meropenem com polimixina, onde o mecanismo de ação basicamente compreende enquanto um rompe a barreira, o outro antibiótico tem caminho livre para ação, no momento em que acontece a lise há interrupção também de mecanismos de resistência como bombas de efluxo (ZUSMAN, 2017). Contudo há poucos estudos exemplificando terapias combinadas das polimixina com outras drogas, necessitando de mais ensaios clínicos randomizados para avaliação de efetividade para efeito de comparações.

As tetraciclinas têm sido amplamente utilizadas de forma empírica no tratamento de bacteremias e meningites bacterianas. Tem como função inibir a síntese proteica ao impedir a ligação do t-RNA à subunidade menor do ribossomo bacteriano – 30S, induzindo danos à membrana (JOSHI, 1997). A tigeciclina é comumente utilizada pelo mundo, porém ela não tem uma boa permeabilidade na barreira hemato-encefálica podendo muitas vezes ocasionar falha terapêutica (RANJBAR, 2019). Muitas vezes ela é relatada sendo utilizada em tratamentos associados para uma melhor eficácia, porém não se é recomendado devido à falta de estudos randomizados de avaliação de efetividade de tigeciclina com polimixina (WU, 2019; ZUSMAN, 2017). A doxiciclina aparentemente parece ser promissora quanto à efetividade clínica e microbiológica contra o CRAB, durante esta escassez de opções terapêuticas (FALAGAS, 2005). Contudo, há poucos estudos observacionais em populações com uso de doxiciclina.

A amicacina (aminoglicosídeo) tem sido utilizada como opção terapêutica quando o isolado de *A. baumannii* apresenta sensibilidade em testes in vitro. É responsável por inibir a síntese proteica bacteriana (HANG, 2007). Geralmente é utilizada associada a outro antimicrobiano, como os carbapenêmicos e polimixinas. Muitos isolados de CRAB apresentam alta resistência a aminoglicosídeos estando correlacionadas pela produção de enzimas modificadores de aminoglicosídeos (AMEs), os mais comuns são AAC (6')-Ib descritos em um estudo com 89 % de presença nos isolados de *A. baumannii* responsáveis pela conferência a resistência em amicacina; e AAC (6')-IIb (ZHAO, 2015).

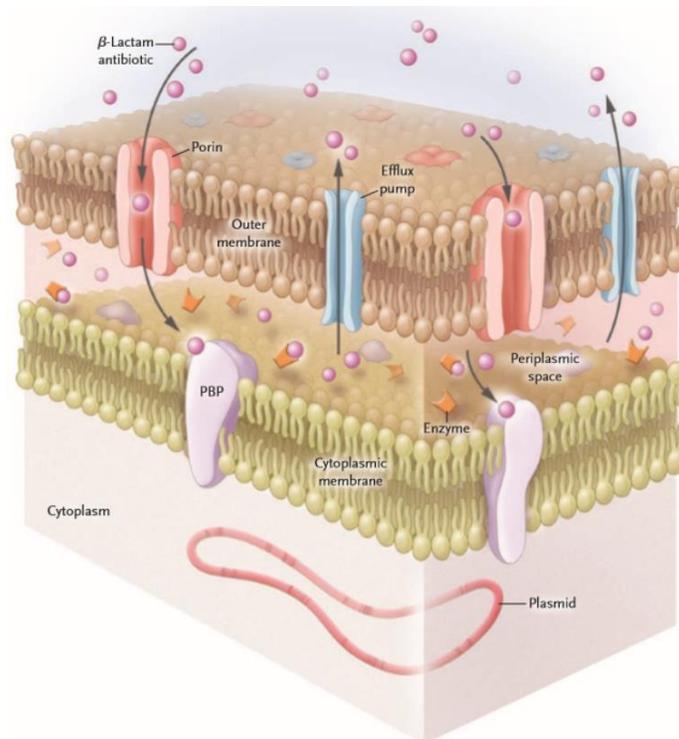
## 1.4 Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos

O maior desafio no tratamento das infecções associadas ao *A. baumannii* está relacionado com a multirresistência, principalmente aos carbapenêmicos. Além disso, este micro-organismo apresenta um perfil de resistência amplo a várias classes de antimicrobianos como piperaciclina/tazobactam, ampicilina/sulbactam, cefalosporinas (ceftazidima, cefepima), fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (ALMASAUDI, 2018; ANVISA, 2017; HO, 2010).

A resistência pode ser intrínseca, mediada por genes presentes nos cromossomos ou a resistência pode ser adquirida, seja através de troca genética com outras cepas bacterianas, através de transposons ou integrons, (elementos genéticos no cromossomo bacteriano) ou em plasmídeos que transportam múltiplos cassetes com genes de resistência (PELEG, 2008; MUNOZ, 2008).

Algumas cepas apresentam suscetibilidade apenas às polimixinas e tetraciclinas (MARAGAKIS, 2008). O surgimento de resistência a polimixina e colistina ainda é incomum, porém deve-se ter cautela quanto a seu uso (TUON, 2011; KO, 2007).

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *A. baumannii* inserem-se geralmente em três grandes grupos como visto na figura 5: (i) enzimas inativadoras de antimicrobianos, (ii) acesso reduzido a alvos bacterianos (presença de bombas de efluxo, alterações nas proteínas da membrana) e (iii) alteração na afinidade ou superexpressão nas proteínas de ligação à penicilina (PBPs) (MARAGAKIS, 2008; MANCHANDA, 2010; KAMOLVIT, 2015; CLARKA, 2016).



**Figura 5.** Representação dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos pelo *Acinetobacter baumannii*. Legenda: uma membrana externa e uma membrana citoplasmática, entre as quais (o espaço periplasmático)  $\beta$ -lactamases (carbapenemases, AmpC  $\beta$ -lactamases e  $\beta$ -lactamases de espectro estendido) residem. As proteínas de ligação à penicilina (PBPs), localizadas na membrana citoplasmática. Fonte: MUNOZ, 2008.

Alguns estudos descrevem a associação de mecanismos atuando em conjunto para promover resistência aos carbapenêmicos, como o caso de  $\beta$ -lactamases e alterações na membrana externa (ALMASAUDI, 2018; MUNOZ, 2008).

#### 1.4.1 Enzimas Inativadoras de Antimicrobianos

O mecanismo de resistência prevalente encontrado em isolados de *A. baumannii* é a produção de  $\beta$ -lactamases, causando a degradação do anel  $\beta$ -lactâmico, porção ativa da droga. Segundo a classificação de Ambler, elas são divididas em quatro classes moleculares: (A) possuem uma serina no local ativo, também chamadas de serina carbapenemases e são suscetíveis à inibição do ácido clavulânico; (B) são dependentes de zinco, também chamadas

de metalo- $\beta$ -lactamases, mais suscetíveis ao EDTA; (C) possui uma serina no local ativo, são chamadas de AmpC; (D) possui uma serina no local ativo, são chamadas de serina carbapenemases ou oxacilinases (AMBLER, 1980).

A classe A, são conhecidas por hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. A primeira descrição de gene ESBL em isolados de *Acinetobacter baumannii*, foi o PER-1 na Turquia, porém mais tarde foi identificado a nível mundial, incluindo a Coreia do Sul, Hungria, Itália, França, Bélgica, Roménia, Estados Unidos e China (YONG, 2003). Após esse período já foram descritos vários genes de espectro estendido em *A. baumannii*, como TEM-92 (Itália), TEM-116 (Países baixos), SHV-12 (China e Países baixos), CTX-M-2 (Japão), CTX-M-43 (Bolívia), VEB-1 (França), VEB-1a (Bélgica e Argentina), PER-2 (Argentina), GES-11 (França e Bélgica), GES-12-14 (França), CTX-M-15 (Haiti), SVH-5 (Nova Iorque) (NAAS, 2007; POTRON, 2011; BONNIN, 2011; ALMASAUDI, 2018). Em 2010, foi relatado o primeiro caso de carbapenemase KPC em *Acinetobacter sp.*, em Porto Rico, uma nova variante desta enzima denominada KPC-10 (ROBLEDO, 2010).

As cefalosporinases conhecidas como AmpC estão presentes de forma intrínseca em cepas de *A. baumannii*, também conhecidas como cefalosporinase derivada de *Acinetobacter* (ADCs) degradando penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, com exceção da cefepima e carbapenêmicos (MANCHANDA, 2010; PELEG, 2008). Em 2010, foi descrita a primeira cefalosporinase em *A. baumannii* capaz de hidrolisar a cefepima, foi denominado de ADC-33 (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2010). Estão registrados no *GenBank* cerca de 28 genes *bla*<sub>ADC</sub> (ALMASAUDI, 2018).

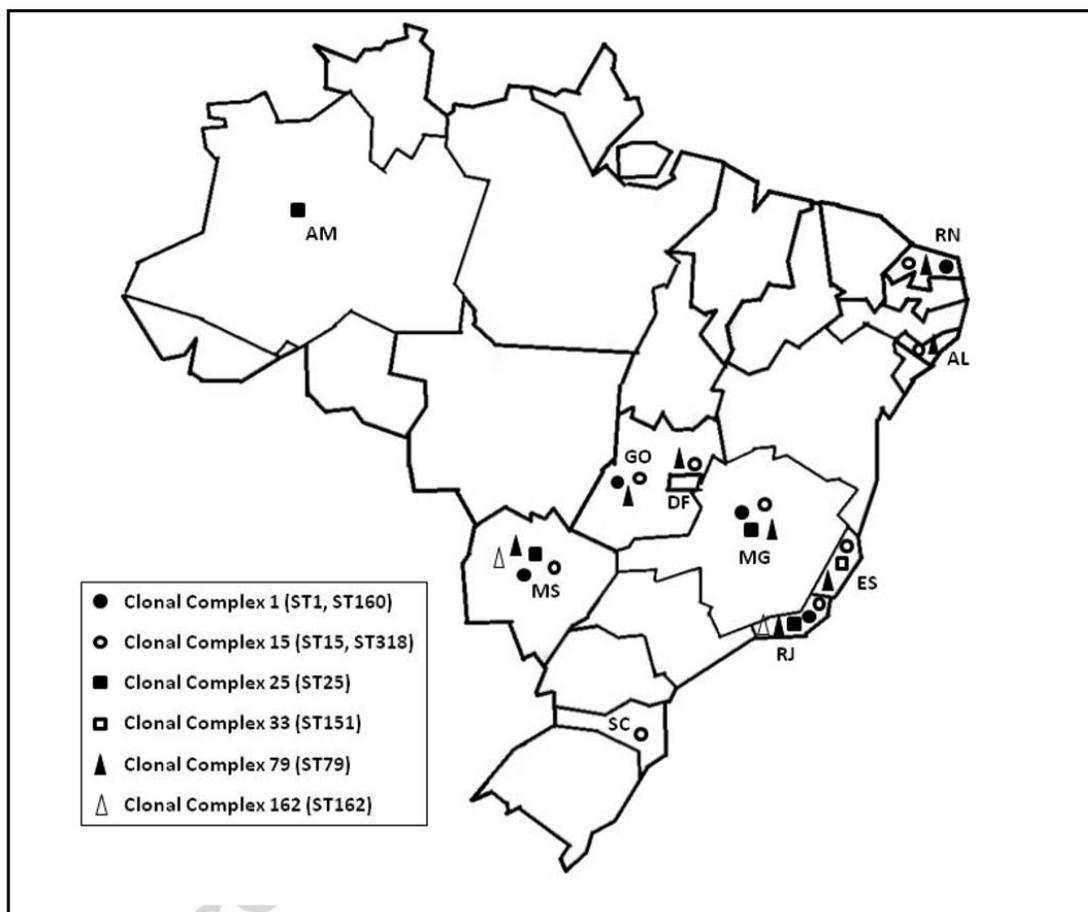
A classe B inclui metalo- $\beta$ -lactamases (MBL), relatados em cepas de *A. baumannii* desde os anos 2000, e conferem resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos com exceção dos

monobactâmicos (DIJKSHOORN, 2007; MARAGAKIS, 2008; POIREL, 2002). Dois grupos são os mais relatados em *A. baumannii* Verona *integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamases* (VIM) e *Imipenem hydrolyzing  $\beta$ -lactamase* (IMP). Vários genes já foram descritos como IMP-1 (Itália, Coreia do Sul, Japão), IMP-4 (Hong Kong), IMP-5 (Portugal), IMP-6 (Brasil), VIM-1 (Grécia), VIM-2 e SIM-1 (Coreia do Sul) (MANCHANDA, 2010; GALES, 2003). Em 2010, ocorreu o primeiro relato da produção de NDM em *A. baumannii* na Índia, onde três isolados produziram a enzima NDM-1 juntamente com *bla*<sub>OXA-23</sub> (KARTHIKEYAN et al, 2010). Em 2014, foi descrito o primeiro caso no Brasil de NDM-1 em um isolado de infecção urinária (PILLONETTO, 2014).

No entanto, as carbapenemases mais difundidas em *A. baumannii* são as  $\beta$ -lactamases da classe D. Além das enzimas intrínsecas do tipo *bla*<sub>OXA-51</sub> para esta espécie, foram distinguidos três grupos não relacionados dessas oxacilinases que hidrolisam carbapenêmicos, representados por *bla*<sub>OXA-23</sub>, -24 e -58 (DIJKSHOORN, 2007).

A primeira descrição da presença do gene *bla*<sub>OXA</sub> contra a classe dos carbapenêmicos foi em 1985 em Edimburgo, na Escócia, onde se verificou por sequenciamento que era um gene de resistência transferível através de troca plasmidial, e foi denominado como *bla*<sub>OXA-23</sub> (PELEG, 2008). No Brasil observa-se presença deste gene desde os anos 90 (figura 6), e observou uma ampla distribuição geográfica da presença de *bla*<sub>OXA-23</sub> pelo país, infelizmente neste estudo não foi incluído isolados bacterianos do estado do Paraná (CHAGAS, 2014). Contudo este gene é o mais comumente encontrado no Paraná, o primeiro caso observado deste gene foi na cidade de Curitiba, em 1999, com a descrição de oito isolados bacterianos (DALLA-COSTA, 2003). Villegas *et al.*; em 2003 descreveu um surto de clones de *A. baumannii* que produzem *bla*<sub>OXA-23</sub> na Colômbia, outro país da América Latina. Este gene

também foi documentado em cepas associadas a surtos de CRAB na Ásia, Europa e América do Sul (ZHAO, 2015).



**Figura 6.** Distribuição geográfica dos clones detectados em diferentes estados brasileiros pelo *Acinetobacter baumannii*. Legenda: AL, Alagoas; AM, Amazonas; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; SC, Santa Catarina. Fonte: (CHAGAS, 2014).

#### 1.4.2 Acesso Reduzido a Alvos Bacterianos

A OmpA - proteína da membrana externa A - tem sido sugerida como detentora de uma variedade de funções como adesão às células epiteliais do hospedeiro, função do biofilme e resistência ao complemento. Em um estudo realizado em camundongos com pneumonias induzidas por *A. baumannii*, quando rompida a membrana houve uma redução significativa da

mortalidade, sugerindo que a OmpA seria responsável pela virulência nas cepas de *A. baumannii* (WONG, 2017).

Os canais de porina e outras proteínas da membrana externa são importantes para o transporte de agentes antimicrobianos para dentro da célula para obter acesso aos alvos bacterianos. A resistência aos carbapenêmicos tem sido ligada à perda de proteínas através de seus canais de porina da membrana externa (ALMASAUDI, 2018). É provável que as  $\beta$ -lactamases e as alterações da membrana externa trabalhem em conjunto para conferir resistência aos agentes  $\beta$ -lactâmicos (MARAGAKIS, 2008).

A perda da permeabilidade da membrana, devido a alterações em porinas específicas, é um mecanismo intrínseco de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*. Um OMP designado como CarO, se interrompido pela sequência de inserção, alterações na estrutura primária ou diminuição da expressão, traz como consequência dificuldades para o antibiótico adentrar na célula, contribuindo para a resistência a esse antibiótico (ZHAO, 2015).

As bombas de efluxo são capazes de remover ativamente uma ampla gama de agentes antimicrobianos da célula bacteriana através das proteínas transmembranas. São compostas pela bomba presente na membrana citoplasmática, canais de poro que atravessam a membrana externa e uma lipoproteína de ligação entre as duas (ALMASAUDI, 2018). Geralmente a superexpressão das bombas de efluxo atuam em associação com  $\beta$ -lactamases. Além de remover antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, as bombas de efluxo podem expulsar ativamente quinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprim, desinfetantes e tigeciclina (MUNOZ, 2008).

O sistema AdeABC é o tipo de bomba da família (RND) mais proeminente em *A. baumannii*, AdeB cria o componente de membrana transmembrana, AdeA forma a proteína de fusão da membrana interna, e AdeC forma a OMP, responsáveis pela expulsão de  $\beta$ -

lactâmicos (NOWAK, 2015). Alguns estudos já descrevem a presença de genes de resistência tetA e tetB, um tipo de bomba da família MFS, em algumas cepas causando resistência a tetraciclina e minociclina (RANJBAR, 2019).

### **1.4.3 Alteração na afinidade ou superexpressão nas proteínas de ligação à penicilina (PBPs)**

A suscetibilidade reduzida a carbapenêmicos também foi associada à modificação de proteínas e porinas de ligação à penicilina (ZHAO, 2015).

As proteínas de ligação à penicilina (PBPs), localizadas na membrana citoplasmática, constituem os alvos finais dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Para se ligar a esses alvos, os antibióticos devem atravessar a membrana externa através dos canais de porina (proteínas da membrana externa) para o espaço periplasmático. Uma vez no espaço periplasmático, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos se ligam às PBPs ou são ativamente expelidos da estrutura bacteriana através das bombas de efluxo (MUNOZ, 2008).

## **1.5 Agentes Biocidas**

Os antissépticos e agentes biocidas são amplamente utilizados em hospitais ao cuidado a saúde, sendo essenciais no controle de infecções auxiliando na profilaxia das IRAS (MCDONNELL, 1999). Alguns estudos demonstraram que há redução de carga microbiana associada ao uso de desinfetantes (RUTALA, 2008). Para o controle da propagação é aconselhável que seja realizado no ambiente inanimado direto do paciente por desinfecção de rotina. O maior aliado na limpeza destes itens são os agentes biocidas.

Os desinfetantes ou biocidas são agentes responsáveis por inibir ou inativar o crescimento bacteriano em objetos ou superfícies (MCDONNELL, 1999). Sendo extremamente fundamentais, pois superfícies ambientais e instrumentos médicos e cirúrgicos podem servir como veículos para agentes infecciosos caracterizando uma transmissão cruzada ou a transmissão de fonte comum (BOUZADA, 2010; VILLEGAS, 2003).

Os agentes biocidas mais utilizados no âmbito hospitalar para realização da desinfecção são: o glutaraldeído, a associação de ácido peracético/ peróxido de hidrogênio (0,5 a 2%), hipoclorito de sódio (1%), iodóforos, derivados de fenol, álcool etílico a 70%, álcool isopropílico a 92%, compostos de amônio quaternário (cetrimida, cloreto de benzalcônio), biguanidas (clorexidina), bisfenol (triclosan), entre outros (BOUZADA, 2010; ANVISA, 2012; WAND, 2017). Muitos destes biocidas podem ser utilizados isoladamente ou em combinação cuja atividade varia conforme o espectro de ação que deseja alcançar. Os mecanismos de ação dos biocidas são variados, de amplo espectro que incluem a lise e coagulação de componentes intracelulares, perturbação da homeostasia celular, ação sobre as membranas e a parede celular, inibição de enzimas, do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa, interação com macromoléculas entre outros (MCDONNELL, 1999).

A sobrevivência e propagação de CRAB no ambiente hospitalar é uma preocupação constante. Em caso de surtos o ambiente pode desempenhar um papel significativo na transmissão de patógenos nosocomiais (KRAMER, 2006; PATEL, 2019; ZHAO, 2015). É extremamente necessário à avaliação de clones endêmicos na instituição hospitalar para avaliação inicial se a fonte da infecção é responsabilizada pela transmissão cruzada. Quando a cepa multirresistente investigada é isolada de vários pacientes diferentes ou relacionados confirmam uma transmissão cruzada. A capacidade de sobrevivência de isolados de *Acinetobacter baumannii* em superfícies inanimadas dificulta o controle das IRAS.

Para o controle de IRAS ser bem sucedido são necessárias medidas de intervenções progressivas e múltiplas ao longo do tempo, como desinfecção ambiental rigorosa após a alta de todos os pacientes afetados, prescrição controlada de antimicrobianos, programa adequado de limpeza de mãos, e culturas de vigilância rotineiras com o intuito de identificar rapidamente e isolar os pacientes recém-colonizados por *A. baumannii* (VILLEGAS, 2003). Um único contato manual com uma superfície contaminada resulta em um grau variável de transferência de patógenos (KRAMER, 2006). A atividade biocida é também influenciada por uma variedade de fatores incluindo o pH, a presença de matéria orgânica, a temperatura, a concentração e o tempo de contato (WAND, 2017).

Para o tratamento adequado das superfícies hospitalares deve ser ter cuidado quanto à persistência de patógenos nosocomiais em superfícies inanimadas. Ou seja, quanto mais tempo um patógeno nosocomial persistir em uma superfície, mais tempo pode ser uma fonte de transmissão e, assim, pôr em perigo um paciente suscetível ou profissional de saúde (RUTALA, 2008). Com isso a escolha correta do agente biocida é de extrema importância para obtenção de sucesso na desinfecção ambiental.

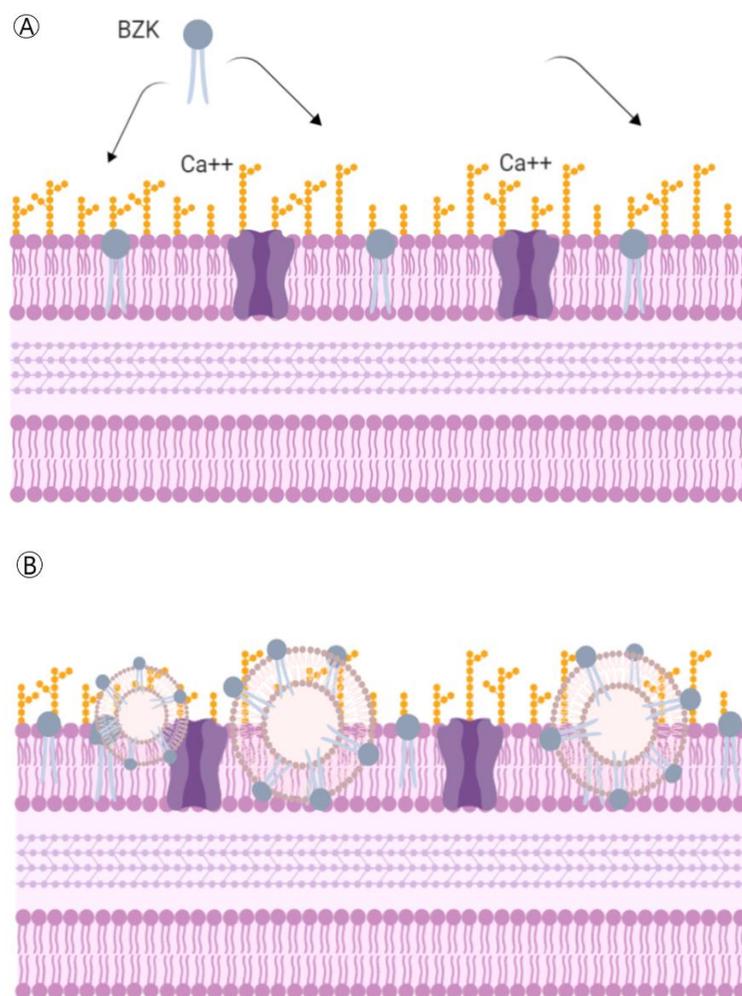
### **1.5.1 Cloreto de benzalcônio – BZK**

Os compostos quaternários de amônio, como o cloreto de benzalcônio (BZK), estão entre os biocidas mais comumente usados no âmbito hospitalar na forma associada com outros agentes biocidas, como por exemplo, as biguanidas. São considerados agentes não específicos reativos à membrana. Em baixas concentrações (0,5-5 mg/L), são algistáticos, bacteriostáticos, tuberculostáticos, esporostáticos e fungistáticos. Em concentrações de 10-50 mg/L, são microbicidas para estes mesmos grupos, dependendo do organismo e da formulação específica

(GERBA, 2015). Também são atribuídas funções intracelulares como inativação de enzimas produtoras de energia, desnaturação de proteínas celulares essenciais e extravasamento de íons e prótons de potássio, porém ações ainda pouco estudadas (RUTALA, 2008; KNAUF, 2018). É um composto de baixa toxicidade sendo encontrado em áreas como a indústria alimentar e produtos de consumo para limpeza e sanitização, e desinfecção de superfícies e, além disso, pode ser utilizado em desinfecção da pele no pré-operatório (GERBA, 2015).

Em um estudo foi demonstrado a ação deste agente biocida em relação a cepas de *A. baumannii*, o qual promove danos à membrana celular, realizando uma ruptura da homeostase da proteína celular levando a morte do microrganismo (KNAUF, 2018).

A membrana externa dos micro-organismos tem a característica de possuir carga negativa, os quais são estabilizados pela presença de cátions divalentes. Com isso ocorre uma atração de substâncias catiônicas, como os compostos quaternários de amônio, os quais sequestram estes cátions pela ação de agentes quelantes como o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). Desta forma eles se adentram com facilidade na membrana, absorvendo moléculas ácidas do envelope bacteriano enquanto suas cadeias longas de alquilas solubilizam a membrana quando se adentram na membrana externa. Provocando uma desorganização da membrana, em concomitância ocorrem eventos intracelulares relatados acima. Devido à perda osmorregulatória da membrana, há uma diminuição da hidrofobicidade e os fosfolipídios em conjunto com o BZK formam agregados micelares. Resultando na lise da membrana externa provocada por enzimas autolíticas ocorrendo perda da organização estrutural da membrana citoplasmática da bactéria, observada na figura 7 (GILBERT, 2005; MCDONNELL, 1999).



**Figura 7.** Mecanismo de ação do biocida cloreto de benzalcônio – BZK na membrana externa do micro-organismo. A: BZK em primeiro contato com a parede, adentrando na membrana citoplasmática. B: Formação de micelas entre o BZK e os fosfolipídeos, resultando em desestruturação da membrana externa. Fonte: o autor, adaptado de Gilbert, *et al*; 2005.

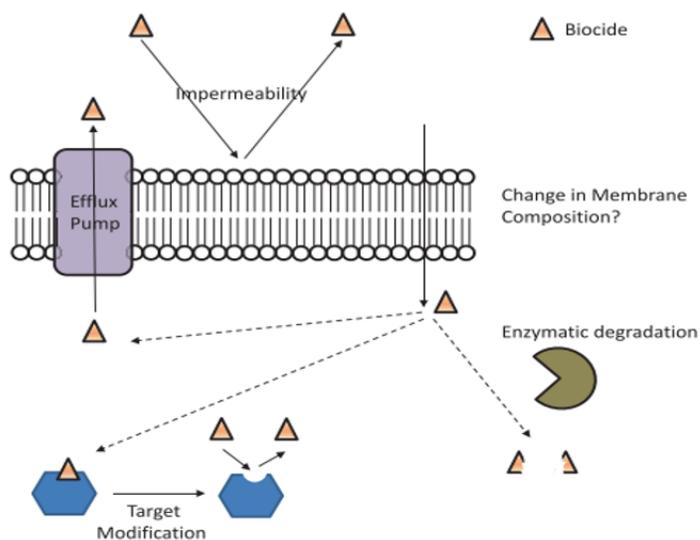
A ANVISA recomenda o seu uso associado a outros detergentes e, a sua retirada da superfície deve ser completa através do enxague com água em abundância. A concentração aplicada depende das formulações dos fabricantes (ANVISA, 2012). O método de aplicação de um desinfetante deve possuir a dosagem e o material adequados. Por exemplo, sua dose efetiva pode ser comprometida pela combinação com esfregões de algodão e toalhas de limpeza, reduzidas em 50 a 83% pelo algodão e pelos panos de microfibras. Sendo de extrema

importância a utilização de concentrações mais elevadas contidas nos rótulos dos produtos (GERBA, 2015).

### **1.5.2 Mecanismos de Resistência ao BZK**

Considerando a fácil disseminação no ambiente hospitalar de isolados de *Acinetobacter baumannii*, uma das preocupações é a possível resistência aos agentes usados na limpeza de superfícies hospitalares. A resistência antisséptica tem sido descrita para vários agentes incluindo biguanidas (clorexidina), compostos quaternários de amônio (BZK) e diamidinas (propamidina), estando muitas vezes atribuídas a bombas de efluxo (BOOST, 2014). A exposição excessiva a agentes biocidas ou concentrações sub-inibitórias pode estar resultando em resistências adquiridas a estes agentes (MARTRO´A, 2003; VIJAYAKUMAR, 2018).

Os mecanismos de resistência intrínseca presentes de forma natural observados em algumas cepas podem ser definidos como: (i) a ausência de afinidade do biocida ao alvo bacteriano; (ii) a extrusão do biocida por exportadores ativos intrínsecos; (iii) a inacessibilidade do biocida a célula bacteriana; (iv) e a produção inata de enzimas que inativam o biocida (figura 9). E também existem fatores como a produção de biofilmes que algumas cepas são naturalmente capazes de fazer, reduzindo como consequência a eficácia dos biocidas (WAND, 2017).



**Figura 8.** Mecanismos de resistência ao agente biocida: impermeabilidade da membrana; mudança da composição da membrana; degradação enzimática; mudança do sitio ativo e ação das bombas de efluxo. Fonte: Wand, 2017.

E algumas cepas são capazes de adquirir mecanismos de resistência extrínsecos através de troca genética mediada via plasmídeos – transposons ou integrons – potencializando sua capacidade de disseminação nosocomial (ALMASAUDI, 2018; HAWKEY, 2018; MEYERA, 2010; PELEG, 2008).

Knauf *et al* (2018), constatou que a resistência ao cloreto de benzalcônio se desenvolve através de mutações proteicas ribossômicas que protegem o *A. baumannii* contra à agregação proteica induzidas pelo biocida. Uma combinação de impermeabilidade da parede celular e da membrana externa justificados pelo aumento de expressão da proteína OprR já foram descritos como adjuvantes na resistência ao BZK (ATSUSHI, 2003).

Contudo alguns estudos descrevem que a resistência aos biocidas frequentemente é mediada pela aquisição ou hiperexpressão de bombas de efluxo multidrogas, proteínas que expulsam substâncias para fora das células, através do intermédio de ATP ou bombas de prótons. Estas bombas geralmente são codificadas por vários genes localizados em

plasmídeos, por exemplo, o gene *qac*, possível responsável pela resistência aos biocidas (MEYERA, 2010).

Os genes *qac* são divididos em dois grupos; (i), genes *qac A/B* presentes a uma família multifacilitadora; e (ii), pequeno grupo de resistência a múltiplas drogas, que incluem *qac C/D*, *qac E*, *qacEΔ1*. O *qacEΔ1*, é responsável pelo transporte de substratos através de bombas de efluxo de prótons, e estão presentes em plasmídeos ou íntegrans de classe I, e frequentemente sua presença está associada ao uso de compostos de quaternários de amônio. (GOMAA, 2017; SCHNEIDERS, 2008; ZHAO, 2015). Por estarem presentes em elementos genéticos móveis, possuem um alto potencial de virulência, e sua localização próxima de genes que conferem resistência a múltiplos antimicrobianos sugere-se uma aquisição de resistência cruzada nestes isolados bacterianos resultando em uma pressão seletiva ambiental de cepas multirresistentes (SHAFATI, 2016; PAULSEN, 1993).

## 2. JUSTIFICATIVA

A OMS – Organização Mundial de Saúde - tem trazido ao longo dos anos a importância da pesquisa sobre novos medicamentos contra cepas altamente resistentes aos antimicrobianos. Constituindo uma ameaça à saúde pública em todo o mundo o CDC - órgão regulador estima que há ocorrência de 45.000 casos de infecções por ano nos Estados Unidos e cerca de um milhão de casos globalmente por ano, ocasionados pelo *Acinetobacter* (WONG, 2017). Estes números são estimadas em 700.000 mortes que ocorrem em todo o mundo por causa de infecções por micro-organismos resistentes a antimicrobianos, número que deve subir para 10 milhões em 2050 (PATERSON, 2020).

O tratamento de cepas de *A. baumannii* resistentes às múltiplas drogas geralmente é limitado aos carbapenêmicos, mais a emergência de cepas resistentes ao imipenem e meropenem é uma grande preocupação. Sendo assim, a disseminação global destes organismos enfatiza o potencial epidêmico deste patógeno (HO, 2010).

As cepas de CRAB tendem a ser XDR - isto é, resistentes a todos os outros antibióticos, com exceção das polimixinas, tigeciclina e, às vezes, aminoglicosídeos (WONG, 2017). A incidência e a disseminação de isolados de *Acinetobacter baumannii* XDR no âmbito hospitalar enfatizam a necessidade de adesão rígida aos programas de vigilância, a fim de evitar a colonização e a infecção por bactérias multirresistentes e a disseminação da resistência a antibióticos e aos agentes biocidas (ZARRILLI, 2007). A perda progressiva de opções terapêuticas nos traz um desafio quanto ao tratamento de infecções por este micro-organismo. O CDC recomenda quatro ações para parar a resistência: prevenindo infecções e a velocidade da resistência, rastreando clones, desenvolvimentos de novas drogas e testes de diagnósticos, e improvisando o uso dos antibióticos (HAMPTON, 2013).

O CRAB tem uma alta capacidade de sobrevivência em superfícies inanimadas, e a frequência observada de IRAS ocasionadas por ele muitas vezes está relacionada à limpeza de superfícies e materiais médicos hospitalares. A importância da correta desinfecção já foi enfatizada em vários estudos descrevendo surtos endêmicos deste patógeno devido à contaminação ambiental constituindo um importante reservatório de cepas selecionadas multirresistentes (DANCER, 2009; KOCA, 2018). Evidenciando que uma das mais importantes intervenções no controle das IRAS é a limpeza das superfícies e manejo adequado dos profissionais de saúde. Necessitando de análises corriqueiras para o procedimento adequado da limpeza das superfícies ao combate das IRAS e constantes atualizações e treinamentos das equipes de saúde. Não podemos esquecer que as políticas de limpeza variam; dependendo muito dos recursos disponíveis e do apoio político, dificultando a realização de forma adequada do serviço para a prevenção das IRAS neste aspecto (DANCER, 2014).

Considerando a falta de estudos demonstrando a sensibilidade destes microorganismos à agentes desinfetantes (GOMAA, 2017). Considerando a grande diversidade de achados de cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes à carbapenêmicos, a descrição de surtos hospitalares desta bactéria em diferentes cenários. É de suma importância avaliar a suscetibilidade dos antibióticos e a suscetibilidade do cloreto de benzalcônio (desinfetante de escolha) em cepas de *Acinetobacter baumannii*.

### **3. OBJETIVO**

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do cloreto de benzalcônio em isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter baumannii* identificados em um Hospital Universitário.

#### **3.1. Objetivos Específicos**

3.1.1. Verificar a similaridade genética dos isolados encontrados.

3.1.2. Verificar a suscetibilidade dos antimicrobianos amicacina; colistina; ceftazidima; cefepime; ciprofloxacina; doxiciclina; gentamicina; meropenem; imipenem; polimixina B; piperacilin/tazobactam e determinar sua concentração inibitória mínima.

3.1.3. Definir o percentual de resistência a carbapenêmicos e a presença do gene de resistência *bla<sub>OXA-23</sub>*.

3.1.4. Identificar o gene de resistência *qacEΔ1* nos diferentes clones.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Isolamento das Amostras

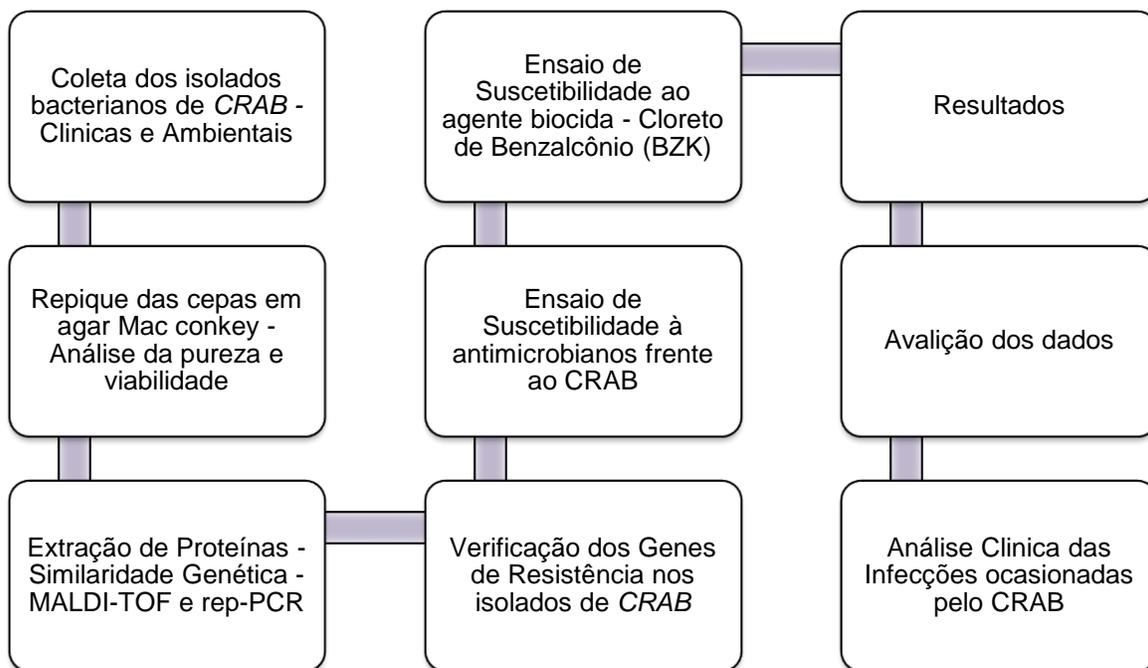
Estudo retrospectivo do ano de 2018, realizado através de isolados bacterianos provenientes de um Hospital de grande porte de Curitiba/ Paraná – Hospital Universitário Cajuru (HUC). Foi analisado um total de 50 isolados bacterianos com resultado positivo para CRAB. Do total; 44 amostras provêm de diversos sítios como: secreções de feridas (n=4), cultura de líquidos (n=2), lavado bronco-alveolar (n=5), aspirado traqueal (n=22), swab retal (n=2), abscessos (n=1), hemoculturas (n=6) e urina (n=2). Seis isolados ambientais de CRAB foram incluídos, sendo provenientes de swabs de superfície; colchão, mesa auxiliar, cabeceira/grade; de um box da UTI; onde três swabs foram colhidos pré-desinfecção dos móveis e três swabs pós-desinfecção dos móveis.

Os isolados bacterianos foram congelados em meio TSB com 15% de glicerol. Para início dos ensaios foram repicados em ágar Mac Conkey e incubados em estufa à 37°C por 18-24 horas; com a finalidade de visualização de pureza e viabilidade da cepa. Posteriormente, elas foram conduzidas para o protocolo proposto de análises destes isolados (fluxograma 1).

O projeto foi aceito pelo comitê de ética sob o número CAAE: 21789719.5.0000.0020. O artigo foi submetido para a revista *Journal Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* com fator de impacto 2.314, pelo *Journal Metric*; fator de impacto de 1.15 pela Scimago Q1 na área de Medicina e Doenças Infecciosas e Qualis A2 perante a qualificação da plataforma da CAPES, do Ministério da Saúde.

O artigo foi submetido para a revista *Journal Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* com fator de impacto 2.314, pelo *Journal Metric*; fator de impacto de 1.15 pela

Scimago Q1 na área de Medicina e Doenças Infecciosas e Qualis A2 perante a qualificação da plataforma da CAPES, do Ministério da Saúde.



**Fluxograma 1:** Fluxograma demonstrando a sequência de processamento das amostras.

#### 4.2. Similaridade Genética das cepas de *Acinetobacter baumannii*

Para extração das proteínas, foi utilizado o protocolo descrito por Mellmann e seus colaboradores (2008), com adaptações. As cepas foram inoculadas em 300µL de água ultra pura e 900µL de álcool absoluto 99% em um eppendorf, e após foram colocadas para agitação por vórtex por 5 minutos. Fez-se centrifugação à 13000rpm por 1 minuto, após desprezou o sobrenadante e deixou secar o pellet até evaporação total do líquido. Adicionou-se 50µL de ácido fórmico a 70%, e após realizou agitação por vórtex por 5 minutos. Em seguida adicionou 50µL de acetonitrila, e após realizou agitação por vórtex por 5 minutos. Fez-se centrifugação à 13000rpm por 1 minuto. Adicionou 1µL do sobrenadante em slide, após a

secagem à temperatura ambiente adicionou 1µL da matriz (solução de ácido  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic). A detecção direta do micro-organismo foi realizado por espectrometria de massa pelo MALDI-TOF em equipamento Vitek<sup>®</sup> MS (BioMérieux, Durham, EUA). O controle de qualidade das leituras foi realizado utilizando cepa referência de *Escherichia coli* ATCC 8739 (American Type Culture Collection). O MALDI-TOF consiste na identificação por ionização por dessorção a laser assistida por matriz por espectrometria de massa de tempo de voo. É baseada em padrões característicos individuais de proteínas que são encontradas em todos os micro-organismos, ou seja, consiste na separação, identificação e quantificação destas moléculas medindo uma relação entre massa/carga (GOULART, 2013). O padrão detectado foi analisado com relação à similaridade utilizando-se a ferramenta de taxonomia do software Saramis, permitindo a identificação confiável e precisa do micro-organismo, além de permitir a análise de similaridade molecular através da proteômica. Foram considerados clones aqueles que apresentaram similaridades superiores a 75% (MENCACCI, 2013).

Foram selecionados 10 isolados, dentre os grupos de clones diferentes identificados. Posteriormente foram confirmados através de sistema automatizado rep-PCR Diversilab<sup>®</sup> (Biomérieux, Durham, EUA), o qual se baseia em uma amplificação de repetitivas sequências de DNA conservado que estão presentes em diferentes posições no genoma bacteriano (CIESLINSKI, 2013). O procedimento foi realizado conforme protocolo do fabricante. Resumidamente, a colônia bacteriana passa por um processo de extração do DNA o qual é amplificado utilizando rep-PCR por parâmetros previamente estabelecidos. Seu substrato é introduzido posteriormente em um LabChip, e colocado para realizar a corrida em Agilent 2100<sup>®</sup> Bionalyzer (Agilent Technologies). Os isolados que apresentaram similaridade superior a 95% foram considerados clones de rep-PCR (HIGGINS, 2012; MENCACCI, 2013).

#### 4.3. Verificação da Presença do gene *bla<sub>OXA51</sub>*, gene *bla<sub>OXA23</sub>* e gene *qacEΔ1*

Para determinação e corroboração da espécie de *Acinetobacter*, foi realizada a pesquisa do gene *bla<sub>oxa51</sub>*, gene de carbapenemase intrínseca em espécies *baumannii* o qual garante uma rápida avaliação e identificação da espécie (TURTON, 2006; WOODFORD, 2006; ZHAO, 2015).

Para extração do DNA, foi utilizado o protocolo descrito por Misbah e seus colaboradores (2005), com adaptações. As cepas foram inoculadas em 300µL de água ultra pura, e após foram colocados para agitação por vórtex por 1 minuto. Em seguida foram colocadas em termobloco à 95°C, por 5 minutos. A suspensão foi centrifugada por 1 minuto à 10000 rpm.

Para a identificação dos genes foram utilizados pares de oligonucleotídeos, descritos na tabela a seguir.

Gene	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>	Referência
<i>bla<sub>oxa</sub> 51</i>	5'-TGTCTAAGGAAGTGAAGCGTG-3'	5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'	Huang (2012)
<i>bla<sub>oxa</sub> 23</i>	5'-GACACTAGGAGAAGCCATGAAAG-3'	5'-CAGCATTACCGAAACCAATACG-3'	Huang (2012)
<i>qacEΔ1</i>	5'-TAGCGAGGGCTTTACTAAGC-3'	5'-ATTCAGAATGCCGAACACCG-3'	Wang (2007)
Probe			Referência
<i>bla<sub>oxa</sub> 23</i>	6-FAM-CCAGTCTATCAGGAACTTGCGCGA-BHQ_1		Huang (2012)

**Tabela 1.** Descrição dos respectivos pares de oligonucleotídeos e respectivas probes (Invitrogen Brasil Ltda).

Para a realização da PCR em tempo real dos genes *bla<sub>OXA51</sub>* e gene *qacEΔ1*, foram utilizados 9,5 µL de água ultrapura, 0,5 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*, 10µM), 12,5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Made in UK, 20mM) e 2 µL de DNA, totalizando 25 µL por poço de reação, para cada mostra. Para realização da pesquisa de *bla<sub>OXA23</sub>* foi utilizado 0,5 µL de probe (10µM), 0,5 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*, 10µM), e 2 µL de DNA, e qsp. de água ultrapura. Foi utilizado como controle positivo para

pesquisa dos genes *bla<sub>oxa</sub>* uma cepa de *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 (American Type Culture Collection); e uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, positiva para presença do gene *qacEAI* (LACEN-PR). As reações foram amplificadas no termociclador 7500 Fast Real Time System, seguindo os parâmetros: desnaturação de 95°C por 10 minutos, seguido por 35 ciclos de extensão de 95°C durante 30 segundos, e 60°C durante 1 minuto.

Devido a falta de ensaios descritos para pesquisa do gene *qacEAI* por PCR em tempo real, os produtos foram colocados e separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% com adição de brometo de etídio, o produto amplificado leu-se em 300pb (BOOST, 2014). As imagens de gel foram digitalizadas com auxílio do programa Kodak Digital Science ID3.02. Para posterior avaliação de correlação entre as técnicas.

#### *4.4. Ensaio de Suscetibilidade à Antimicrobianos*

Foi realizado a pesquisa de suscetibilidade à antimicrobianos dos isolados bacterianos. Foi testado a concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos amicacina, gentamicina, ciprofloxacino, colistina, imipenem, meropenem, cefepima, ceftazidima, piperaciclina/tazobactam, doxiciclina e polimixina B; realizados por método de microdiluição em caldo de acordo com a CLSI M7-A9. Foi considerada como CIM, aquela correspondente a menor concentração que não obteve crescimento visível ou falta de turbidez, a interpretação dos CIMs esta de acordo com a CLSI M100-28 (2018).

#### *4.5. Ensaio de Suscetibilidade ao Cloreto de Benzalcônio*

Foi realizada a concentração inibitória mínima (CIM) de um composto de quaternário de amônio. O Cloreto de benzalcônio – BZK, cloreto de alquil dimetil benzil amônio (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) - foi diluído conforme instruções do fabricante. O CIM foi determinado

por método de microdiluição em caldo de acordo com a CLSI M7-A9 (WIEGAND, 2008). Foi utilizado como controle uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, positiva para presença do gene *qacEΔ1* (LACEN-PR). Foram preparadas concentrações de diluição do BZK, a partir de uma solução estoque de 1024µg/mL. O qual foi diluído e incorporado no ágar de crescimento Mueller Hinton cátion ajustado (Becton, Dickinson and Company), a concentração final foi de 512µg/mL – 0,25 µg/mL (Vijayakumar, 2018). Foram considerados como CIM, aqueles correspondentes a menor concentração que não obtiveram crescimento visível ou falta de turbidez.

#### 4.6. Análise Estatística

Os dados clínicos foram apresentados como mediana e interquartil ou frequência e porcentagem. As CIM foram expressas como percentis 50 e 90. Para a avaliação da concordância entre os distintos métodos, os dados numéricos serão tratados com os métodos estatísticos de coeficiente Kappa, Cohen's Kappa para as comparações 2 a 2, cujos valores considerados serão: 0 = sem concordância; <0,4 = fraca; 0,41-0,60 = regular; 0,61-0,80 = boa; >0,80 = ótima e 1 = perfeita. Não foram realizados outros testes estatísticos uma vez que o estudo é descritivo.

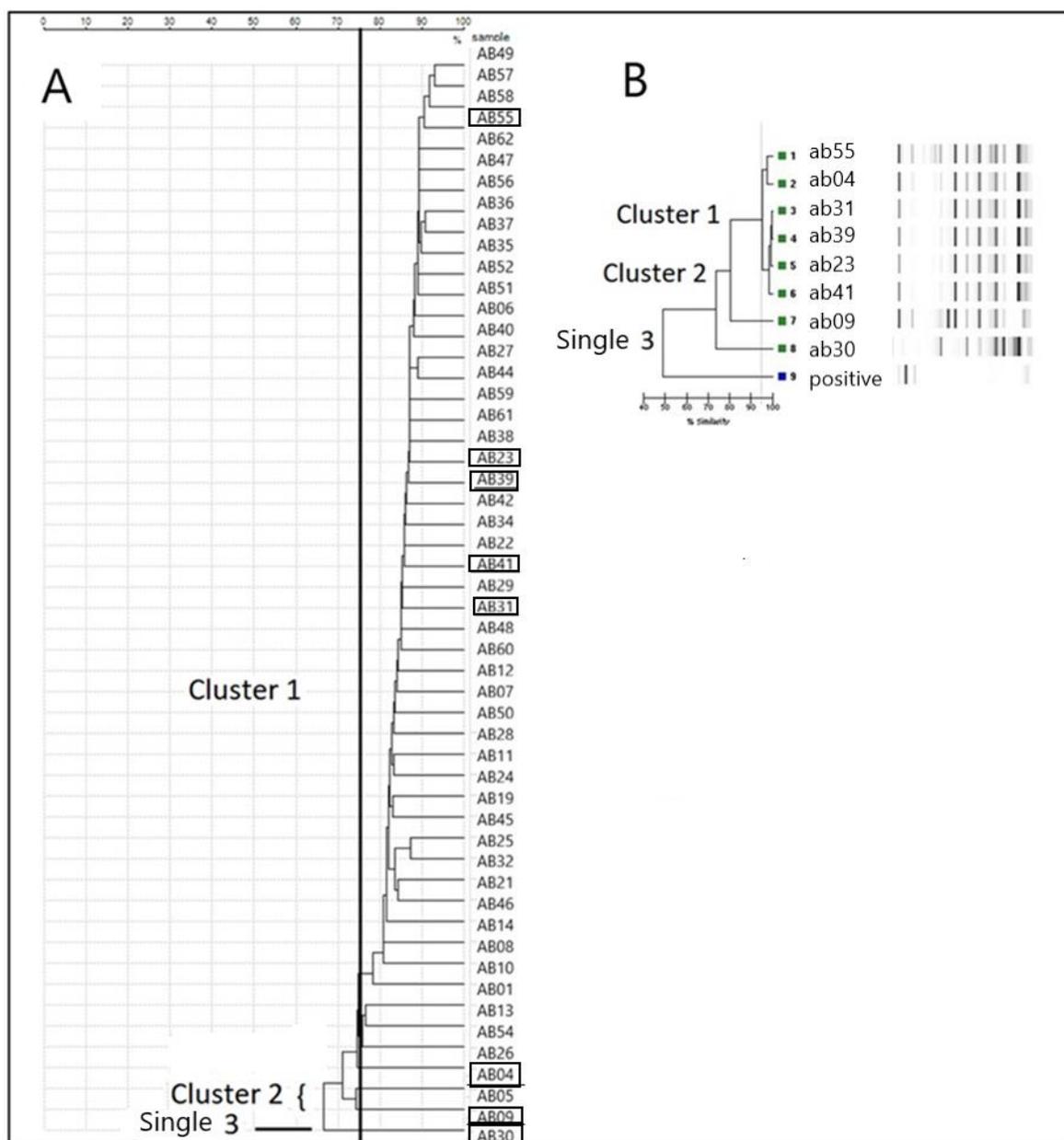
## 5. RESULTADOS

Foram analisados 44 pacientes, onde vinte e nove (66%) eram do sexo masculino e a idade mediana foi de quarenta e oito anos [32-63]. Trinta e um (70,5%) pacientes fizeram uso de ventilação mecânica durante o internamento, e trinta e nove (88,6%) pacientes obtiveram a infecção por CRAB adquirida neste âmbito hospitalar. Foi considerada infecção hospitalar adquirida se; (i) tempo superior à 48 horas de internamento, (ii) tempo superior à 72 horas se paciente transferido de outra unidade hospitalar, (iii) após 7 dias de reinternamento (avaliando as condições clínicas); (iiii) colocação de prótese por mais de um ano. As características clínicas estão contidas na tabela 2.

Foram analisados 50 isolados bacterianos de CRAB. Através da identificação direta por MALDI-TOF, os isolados foram verificados com relação à similaridade utilizando-se a ferramenta de taxonomia do software Saramis. O agrupamento hierárquico dos perfis de pico MALDI-TOF identificou três diferentes agrupamentos de CRAB, com uma taxa de similaridade genômica média de 75 %, o cluster I apresentou um agrupamento de 47 isolados, o cluster II compreendeu 2 isolados, e o cluster III apenas um isolado bacteriano, podendo ser observado na figura 9-A. Dentre o total, foram selecionados 10 isolados bacterianos, e foram avaliados quanto a similaridade por rep-PCR automatizado, análise do padrão das bandas e com uma taxa de similaridade genômica média de 95%, demonstrou a presença dos mesmos três clusters entre os isolados de CRAB, vide figura 9-B. Corroborando os dados de similaridade obtidos pelo software Saramis.

<b>Variables</b>	<b>N (%)</b>
Age, median [IQR]	48 [32-63]
Male, n (%)	29 (66)
Site of infection, n (%)	
Pulmonary	27 (61)
Blood cultures	6 (13.6)
Wound secretions	4 (9.1)
Urinary	2 (4.5)
Sterile body fluid	2 (4.5)
Rectal swab	2 (4.5)
Abscesses	1 (2.3)
Untreated Infection	4 (9.3)
Monotherapy, n (%)	10 (23.2)
Cefepima	1 (2.3)
Gentamicina	1 (2.3)
Meropenem	1 (2.3)
Doxycycline	5 (11.7)
Polymyxin	2 (4.7)
Combined therapy, n (%)	27 (44)
Doxycycline + polymyxin	12 (28)
Polymyxin + amikacin	5 (11.7)
Polymyxin + gentamicina	3 (7)
Doxycycline + cephalosporins	2 (4.7)
Doxycycline + amikacin	2 (4.7)
Polymyxin + cephalosporins	1 (2.3)
Polymyxin + meropenem	1 (2.3)
Doxycycline + cephalosporins + amikacin	2 (4.7)
Doxycycline + polymyxin + gentamicina	1 (2.3)
Death at end-of-treatment with monotherapy, n (%)	5 (50)
Death at end-of-treatment with combined therapy (polymyxin), n (%)	10 (45,5)
Death at end-of-treatment with combined therapy (doxycycline), n (%)	11 (57,9)
Death at end-of-untreated infections, n (%)	4 (100)
Death at end-of-hospitalization, n (%)	20 (46)
Carbapenems resistance, n (%)	50 (100)
Polymyxin resistance, n (%)	0 (0)
Amikacin resistance, n (%)	41 (82)
Use of mechanical ventilation, n (%)	31 (70,5)
Hospital acquired infection, n (%)	39 (88,6)

**Tabela 2:** Características clínicas dos pacientes com infecções por *Acinetobacter baumannii*.



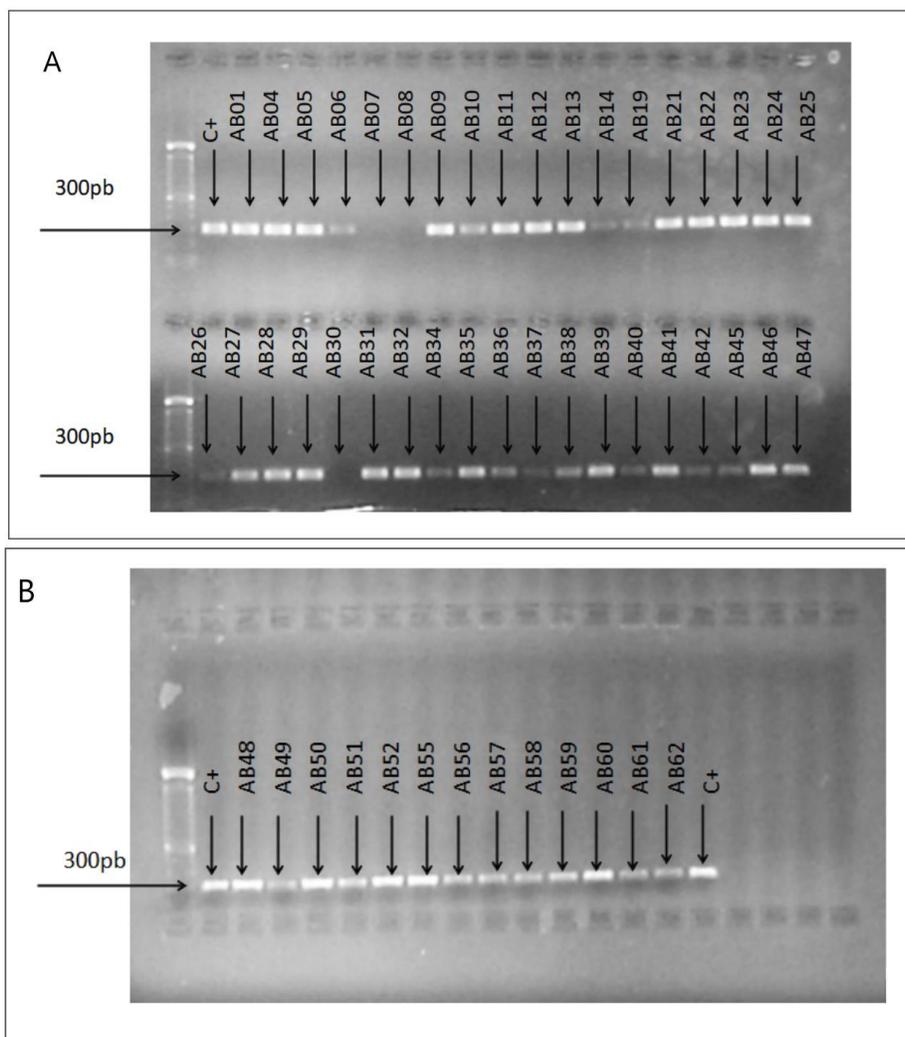
**Figura 9:** Dendrograma descrevendo porcentagem de similaridade, bandas e análise hierárquica de clusters de isolados de *Acinetobacter baumannii* através de MALDI-TOF MS (A) e rep-PCR (B).

Para pesquisa do gene *bla<sub>OXA-23</sub>* e *bla<sub>OXA-51</sub>*, observou-se amplificação em todos os isolados bacterianos, observados na tabela 3. Corroborando com dados observados na tabela 4, com a presença de 100% de resistência encontrada nos antimicrobianos meropenem e imipenem testados nestes isolados, com resultados prevalentes de MIC superior a 8µg/mL.

Para pesquisa do gene *qacEΔ1*, observou-se positividade em quarenta e sete amostras (94%), observados na tabela 3. Este gene é frequentemente observado em combinação com genes que codificam resistência a β-lactâmicos, incluindo carbapenemases. A avaliação da detecção deste gene pelo PCR em tempo real deve ser levada com cautela quanto a índices de positividade, os quais foram observados presença de CTs altos, variando de 12,05 à 37,59. No entanto, quando o produto amplificado foi colocado em gel de agarose para PCR end-point, estes CTs extremos apresentaram bandas visíveis e dadas como positivos para presença do gene nestes isolados de CRAB, como podemos observar na figura 10. Ambas as técnicas para detecção do gene *qacEΔ1*, apresentaram eficientes e igualitárias para a detecção do gene, com índice kappa igual a 1,0.

Test Strain of <i>Acinetobacter baumannii</i>	Presence genes resistance		
	<i>bla<sub>OXA23</sub></i>	<i>bla<sub>OXA51</sub></i>	<i>qacEΔ1</i>
<b>Isolates clinical</b>	100 % (n=44)	100 % (n=44)	93,2 % (n=41)
<b>Isolates environmental</b>	100 % (n=6)	100 % (n=6)	100 % (n=6)

**Tabela 3:** Presença dos genes de resistência testados em isolados de *Acinetobacter baumannii*.



**Figura 10:** Representação das imagens em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR em tempo real para pesquisa do gene *qacEΔ1*. A: Representa resultados do AB01 à AB47; B: representa resultados do AB48 à AB62.

Nos 50 isolados bacterianos foram observados vários perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos. Na tabela 4, todos os isolados foram resistentes à classe das cefalosporinas, quinolonas e ao antimicrobiano associado piperaciclina/tazobactam. A sensibilidade dos antimicrobianos amicacina e gentamicina foram de 4% (n=2), 8% (n=4); respectivamente. Para os antimicrobianos colistina, polimixina, doxiciclina a sensibilidade foi de 100%,

respectivamente seus MICs variaram de 0,25µg/mL á 1,0 µg/mL (MIC<sub>50</sub> = 0,5 µg/mL e MIC<sub>90</sub> = 1 µg/mL); 0,06 µg/mL á 1,0 µg/mL (MIC<sub>50</sub> = 0,25 µg/mL e MIC<sub>90</sub> = 0,5 µg/mL); 0,25µg/mL á 2,0 µg/mL (MIC<sub>50</sub> = 1 µg/mL e MIC<sub>90</sub> = 2 µg/mL). A monoterapia apresentou 50% de obito após término de tratamento. Terapia combinada polimixina + outros ATBs apresentou 45,5% de obito após término de tratamento. Terapia combinada doxiciclina + outros ATBs apresentou 57,9% de óbito após término de tratamento. O número de óbitos obtidos em relação a todos os isolados estudados foi 46% após o término da hospitalização. Para a suscetibilidade do cloreto de benzalcônio (tabela 4) observamos que 70% dos isolados apresentaram MIC igual à 16µg/mL, 28% apresentaram MIC igual à 8µg/mL, e 2% apresentaram MIC igual à 4µg/mL.

Para verificar e/ou associar a presença do gene *qacEΔ1* e a resistência ao uso de quaternários de amônio, foi cruzada as informações obtidas para ambos os parâmetros. Os isolados bacterianos que não apresentaram positividade para o gene *qacEΔ1*, foram AB07, AB08, AB30; com resultados de MIC igual à 16, 8, 16 µg/mL, respectivamente. No entanto o isolado AB26, com resultado de MIC igual a 4 µg/mL, houve a amplificação do gene.

Test Strain	Culture Sites	MIC values of antibiotics (µg/mL)											
		AMK	CST	CFZ	CEP	CIP	DOX	GEN	MEM	IPM	POL	PPT	BZK
AB01	Blood Culture	64 R	1 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB04	Liver abscess	64 R	1 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB05	Tracheal aspirate	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	8 I	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB06	Surveillance swab	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	8 I	>8 R	8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB07	Tracheal aspirate	>64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	8 I	>8 R	8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB08	Tracheal aspirate	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	0,25 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	8
AB09	Surveillance swab	32 I	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB10	Tracheal aspirate	64 R	0,25 S	>32 R	>32 R	>4 R	0,5 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,125 S	>128/4 R	16
AB11	Tracheal aspirate	64 R	1 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB12	Tracheal aspirate	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,5 S	>128/4 R	16
AB13	Tracheal aspirate	>64 R	1 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,5 S	>128/4 R	8
AB14	Urine	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	4 S	>8 R	8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB19	Tracheal aspirate	>64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	4 S	>8 R	8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB21	Tracheal aspirate	64 R	1 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,5 S	>128/4 R	16

AB22	Blood Culture	32 I	0,25 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,5 S	>128/4 R	16
AB23	Blood Culture	32 I	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB24	Bronchoalveolar lavage	8 S	0,25 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB25	MID culture	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,5 S	>128/4 R	16
AB26	Tracheal aspirate	64 R	0,25 S	>32 R	>32 R	>4 R	0,25 S	4 S	>8 R	8 R	0,06 S	>128/4 R	4
AB27	Torax Liquid	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB28	Devitalized tissue MIE	8 S	0,25 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB29	Bronchoalveolar lavage	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB30	Bronchoalveolar lavage	32 I	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	8 I	>8 R	8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB31	Urine	32 I	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,5 S	>128/4 R	16
AB32	Tracheal aspirate	32 I	0,25 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,125 S	>128/4 R	16
AB34	Environmental surveillance (after)-mattress	64 R	0,25 S	>32 R	>32 R	>4 R	0,25 S	8 I	>8 R	8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB35	Environmental surveillance (after)-auxiliary table	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,5 S	>128/4 R	16
AB36	Blood Culture	64 R	0,25 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	8 I	>8 R	4 I	0,25 S	>128/4 R	16
AB37	Blood Culture	64 R	0,25 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	8 I	8 R	8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB38	Tracheal aspirate	>64R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	8 I	>8 R	8 R	0,5 S	>128/4 R	16
AB39	Blood Culture	64 R	0,25 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB40	Tracheal aspirate	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	8 I	8 R	8 R	0,5 S	>128/4 R	8
AB41	Abdominal fluid	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,125 S	>128/4 R	16
AB42	Environmental surveillance (after)-headboard grid	>64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	0,5 S	4 S	>8 R	8 R	0,25 S	>128/4 R	8
AB45	Tracheal aspirate	>64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	0,25 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,5 S	>128/4 R	16
AB46	Waterman Drain secretion	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	0,25 S	>16 R	>8 R	>8 R	1 S	>128/4 R	8
AB47	Tracheal aspirate	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,125 S	>128/4 R	16
AB48	Tracheal aspirate	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,125 S	>128/4 R	8
AB49	Tracheal aspirate	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	8 I	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	8
AB50	Tracheal aspirate	64 R	0,25 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	8
AB51	Blood Culture	64 R	1 S	>32 R	>32 R	>4 R	0,5 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,125 S	>128/4 R	16
AB52	Tracheal aspirate	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB55	Bronchoalveolar lavage	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	0,25 S	>16 R	>8 R	8 R	0,5 S	>128/4 R	16
AB56	Environmental surveillance (before)-headboard grid	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	0,25 S	8 I	>8 R	>8 R	0,5 S	>128/4 R	8
AB57	Tracheal aspirate	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	8 I	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	8
AB58	Tracheal aspirate	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	1 S	>16 R	>8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	8
AB59	Abdomen secretion	>64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	8 I	>8 R	8 R	0,5 S	>128/4 R	8
AB60	Bronchoalveolar lavage	64 R	0,25 S	>32 R	>32 R	>4 R	0,25 S	>16 R	>8 R	8 R	0,25 S	>128/4 R	16
AB61	Environmental surveillance (before)-auxiliary table	64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	2 S	S 4	8 R	>8 R	0,25 S	>128/4 R	8
AB62	Environmental surveillance (before)-mattress	>64 R	0,5 S	>32 R	>32 R	>4 R	0,5 S	S 4	>8 R	>8 R	0,5 S	>128/4 R	8

**Tabela 4:** Sítios de Infecção e concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos/biocida testados em isolados de *Acinetobacter baumannii*. R (resistente), I (Intermediário) or S (sensível) de acordo com o critério de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). A AMK, amikacin; CST, colistina; CFZ, ceftazidime; CEP, cefepime; CIP, ciprofloxacina; DOX, doxycycline; GEN, gentamicina; MEM, meropenem; IPM, imipenem; POL, polymyxin B; PPT, piperacilin/tazobactam; BZK; benzalkonium chloride.

## 6. DISCUSSÃO

De acordo com a OMS – Organização Mundial de Saúde o *Acinetobacter baumannii* está em primeiro na lista de patógenos com disponibilidade terapêutica escassa no âmbito hospitalar. (ALMASAUDI, 2018; MEYER, 2010; HAWKEY, 2018; PELEG, 2008). Além disso, muitas vezes a infecção ocasionada demonstra perfis epidemiológicos complexos e coexistência de múltiplos tipos de cepas. Em resposta a uma pressão ambiental seletiva torna estas cepas altamente resistentes aos grupos de antimicrobianos utilizados dentro das instituições, como a classe dos  $\beta$ -lactâmicos e dos carbapenêmicos.

Nossos dados corroboram com outros estudos que sugerem resistência aos carbapenêmicos adquirida via plasmídeo, encontrados em cepas de *Acinetobacter baumannii*, citada pela ampla distribuição geográfica da presença do gene *bla<sub>OXA-23</sub>* pelo país (CHAGAS, 2014; CIESLINSKI, 2013). Sendo esta, a serina-oxacilinase responsável pela conferência de resistência ao grupo de carbapenêmicos aos nossos CRABs isolados dentro desta unidade hospitalar.

A identificação de cepas em aspectos moleculares deve ser utilizada para identificar surtos de infecção e monitoramento de transmissão interinstitucional, regional e internacional do CRAB, sendo extremamente úteis para identificar rapidamente a emergência e a disseminação de clones multirresistentes (MARAGAKIS, 2008; CLIMACO, 2013).

Observou-se a presença de uma cepa clone circulante neste âmbito hospitalar onde classificou 94% dos isolados encontrados. Esta tipagem molecular sugere-se que estes pacientes são decorrentes de uma fonte comum podendo ou não estar associados à transmissão cruzada entre os pacientes. Podem estar atreladas a itens operacionais, como: equipamentos compartilhados (ventilação mecânica), tubos de ventilação, bolsas de ressuscitação, cateteres

de sucção, sondas, medidores, transdutores de pressão arterial, artigos de cama; entre outros utensílios (VILLEGAS, 2003). Observou-se na tabela 1, que 70,5% dos pacientes que apresentaram infecção por este patógeno fizeram uso de ventilação mecânica. Medidas de controle e prevenção direcionadas a fatores de transmissão são muitas vezes necessárias para minimizar a morbimortalidade associada ao CRAB.

Dos nossos pacientes avaliados, 88,6% apresentaram infecção pelo CRAB adquirida neste âmbito hospitalar. As superfícies inanimadas e o profissional de saúde podem servir de vetores para a propagação deste micro-organismo, atribuída pela transmissão cruzada destes. Nas seis amostras ambientais analisadas todas apresentaram o mesmo perfil de resistência encontradas nas amostras clínicas. Os desinfetantes são sempre utilizados na limpeza hospitalar, com o propósito de profilaxia e controle de transferência de patógenos. Contudo o uso disseminado de produtos antissépticos e desinfetantes leva a especulações sobre o desenvolvimento de resistência microbiana, e resistência cruzada a antibióticos devido à ampla distribuição de genes de resistência à desinfetantes (KRAMER, 2006; LIU, 2017; LING, 2018).

Há uma possível resistência cruzada de compostos quaternários de amônio através de plasmídeos em cepas de MRSA. Em um estudo anterior, um total de 21 amostras de cepas multirresistentes à antimicrobianos – bactérias Gram negativas e Gram positivas - testadas apresentou-se 38% de resistência associada a estes compostos, sugerindo uma provável resistência intrínseca em conjunto aos plasmídeos (GUIMARÃES,2000). Similar a um estudo realizado com isolados de *Staphylococcus* sp., o qual apresentaram altos índices de positividade para genes *qac* associados à valores altos de MIC para BZK (ZMANTAR, 2011).

Os isolados de CRAB apresentaram 94% de presença do gene *qacEΔ1*, indicando uma possível relação entre valores de concentração inibitória mínima encontradas no estudo in

vitro do BZK. Este dado foi visto em um estudo que demonstrou presença do gene em 96,07% de cepas de *A. baumannii* (LIU, 2017). E corrobora com estudos feitos por Wang *et al.*; que descrevem presença deste gene associado a resistência a agentes biocidas em 82,5% em cepas de *A. baumannii* (WANG, 2008). Resultado similar encontrado em outro estudo com 80% de prevalência de positividade nestas cepas (MAHZOUNIEH, 2014). Este gene conferindo resistência á biocidas já foi descrito em vários estudos sugerindo preocupações sobre a expressão genica relacionada aos quaternários de amônio (GOMAA, 2017; ZHAO, 2015; VIJAYAKUMAR, 2018).

Contudo a capacidade de expressão do gene *qacEAI* conferindo resistência a biocidas permanece inespecífica. Foram encontradas em três isolados concentrações inibitórias mínimas sugestivas de resistência sem há presença do gene envolvido. Estes dados sugerem uma possível inexpressão do gene em alguns dos isolados bacterianos de CRAB, ou há presença de outros genes que possam ser responsáveis pela resistência ao biocida, talvez outros mediadores de bombas de efluxo. Há descrição em literatura do envolvimento do sistema de efluxo AdeABC associados ao uso dos biocidas em *A. baumannii* (KNAUF, 2018). Moen *et al.*; descreve a possível presença do gene *acrB* vinculado à resistência ao BZK em cepas de *E. coli* (MOEN, 2012). Alguns estudos relatam que os mecanismos de tolerância aos agentes biocidas podem depender de vários fatores, alterações na permeabilidade da barreira (hidrofobicidade, ou mudança no perfil de ácidos graxos), redução na porina da membrana externa OmpF, entre outros (MOEN, 2012; GARCIA, 2018).

Zmantar *et al.*; fizeram uma correlação com os MICs obtidos frente a cepas de *Staphylococcus sp.*, e estabeleceram uma classificação de resistentes/sensíveis. Foram considerados valores de BZK entre 16 e 32 µg/mL como altamente resistentes, entre 4 e 8 µg/mL como resistentes e 2 µg/mL como sensível (ZMANTAR, 2011). Contudo não existem

pontos de corte na literatura que exemplifiquem a concentração inibitória mínima necessária para redução de contagens bacterianas em uma amostra in vitro para agentes biocidas. O objetivo deste estudo foi avaliar qual era a concentração mínima de BZK que inibia o crescimento dos isolados de *Acinetobacter baumannii* por análises in vitro. A considerar que não existe uma relação da concentração encontrada in vitro, com a concentração necessária in vivo para inibir o crescimento, pois se é utilizada níveis de até 100-200 vezes maiores do que o MIC encontrado para desinfecção (VIJAYAKUMAR, 2018).

A resistência ao BZK se deve muito a outros fatores que possam estar relacionados como tempo de exposição ao agente biocida, ação de fricção, entre outros. O tempo de exposição é um determinante muito importante na avaliação da tolerância adquirida pelo micro-organismo em questão. Testes como “*time kill curve*” (TKC) são necessários para estabelecer uma comparação entre a concentração inibitória mínima de BZK e o tempo necessário para inibição do crescimento.

A concentração sub-inibitória utilizada de BZK utilizada na desinfecção, pode ser uma das respostas para a tolerância desenvolvida ao mesmo, selecionando cepas resistentes. A concentração inibitória mínima encontrada do BZK neste estudo apresentou  $MIC_{50 \text{ e } 90} = 16 \mu\text{g/mL}$ . Em concordância com outros estudos que também apresentaram valores de MIC superior a  $8 \mu\text{g/mL}$ , variando até  $32 \mu\text{g/mL}$ , em isolados de *A. baumannii* (VIJAYAKUMAR, 2018). Porém discordantes com Liu et al.; que mostraram que cepas que apresentaram presença do gene *qac* obtiveram valores mais altos de MIC, como  $64 \mu\text{g/mL}$  (LIU, 2017).

Os isolados de CRAB em nosso hospital apresentaram ampla resistência a várias classes de antimicrobianos disponíveis atualmente, como as cefalosporinas, fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos, e um dos últimos recursos no âmbito hospitalar: os carbapenêmicos. Os CRABs têm sido de grande dificuldade terapêutica, o uso empírico de polimixina, colistina e

doxiciclina, tem sido utilizada com muita frequência e tem sido um aliado no tratamento destas bacteremias. No entanto o uso empírico destas drogas deve ser feito com cautela, devido à presença de efeitos adversos de nefrotoxicidade e neurológicos ocasionados nos pacientes. O surgimento de resistência a polimixina e colistina ainda é incomum, porém deve-se ter cautela quanto a seu uso (TUON, 2011).

Nossos isolados de CRAB obtiveram um MIC para doxiciclina que variou de 0,25µg/mL á 2,0 µg/mL (MIC<sub>50</sub> = 1 µg/mL e MIC<sub>90</sub> = 2 µg/mL). Todos os nossos pacientes apresentaram sensibilidade para doxiciclina, mais alguns estudos já descrevem a presença de genes de resistência *tetA* e *tetB*, em algumas cepas (RANJBAR, 2019). Empiricamente em nosso hospital temos utilizado esta droga como auxiliar no combate ao CRAB, porém devemos utiliza-la com cautela quando resultados obtidos próximos ao MIC<sub>90</sub> = 2 µg/mL, para não induzir resistência pelo uso prolongado.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

✓ Nossos isolados revelaram altos níveis de resistência à maioria das classes de antimicrobianos testados clinicamente disponíveis para o tratamento de infecções por *Acinetobacter baumannii*; como cefalosporinas (ceftazidima e cefepima), quinolonas (ciprofloxacino), a associação piperaciclina/tazobactam, média de 92% de resistência a aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina).

✓ Foi encontrada resistência a todos os isolados para classe dos carbapenêmicos, corroborando com a presença do gene pesquisado *bla<sub>OXA-23</sub>*, sugerindo que este seja o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos.

✓ O gene *bla<sub>OXA-23</sub>* pode ser encontrado mesmo em isolados com MICs intermediários de imipenem.

✓ Nosso estudo mostrou pelo MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> dos antimicrobianos polimixina, colistina e doxiciclina, nos fornecem opções terapêuticas clínicas e microbiológicas eficazes.

✓ Observados por uma redução na susceptibilidade a este agente biocida, 70% dos isolados testados apresentaram MIC=16µg/mL, e 28% MIC=8 µg/mL de cloreto de benzalcônio. Demonstrando que a exposição a concentrações sub-inibitórias carrega a sobrevivência e a pré-seleção de cepas multirresistentes e conseqüentemente a disseminação no âmbito hospitalar.

✓ Tanto as amostras ambientais e clínicas apresentaram os mesmos dados para presença de resistência aos antimicrobianos e ao agente biocida, evidenciando que há uma transmissão cruzada entre as superfícies inanimadas e os pacientes imunocomprometidos. A incorreta desinfecção de superfícies pode levar a seleção de patógenos resistentes.

✓ A similaridade clonal destes isolados deve ser estudada para avaliação de sua disseminação nosocomial, e podem ser avaliados pelo software Saramis.

✓ A relação entre a presença do gene *qacEΔ1* e a concentração inibitória mínima encontrada de cloreto de benzalcônio, nos mostrou que nossos isolados de CRAB possuem um gene de resistência, e está ligado a concentrações elevadas de BZK suficientes para inibir seu crescimento.

As infecções ocasionadas pelo CRAB estão cada vez mais incontroláveis ocasionando perdas progressivas de opções terapêuticas disponíveis no âmbito hospitalar. Em conjunto, esses resultados reforçam a necessidade do controle do uso dos antimicrobianos e a prevenção da disseminação desses organismos, além disso, apontam a necessidade da implementação de medidas de controle de infecção mais eficazes e rigorosas.

Para continuidade deste estudo, pretendemos:

✓ Realizar estudos in vitro para relação entre o tempo de inibição do crescimento do CRAB e a concentração inibitória mínima do BZK suficiente a ser utilizada.

✓ Verificar a concentração inibitória mínima de BZK em cepas sensíveis e multirresistentes de outras espécies bacterianas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, e enterobactérias produtoras de carbapenemases (KPC).

✓ Realizar um estudo in vitro com isolados de CRAB e avaliar sua habilidade de formação de biofilme em corpo de prova previamente estabelecido.

✓ Avaliar a suscetibilidade do BZK em biofilmes formados de CRAB, e compará-los com a concentração inibitória mínima de células sésses obtidas neste trabalho.

✓ Realizar um teste de superfície para avaliação da eficácia de BZK, com o intuito de aprimoramento dos protocolos disponíveis atualmente no âmbito hospitalar para o controle das IRAS.

## 8. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde.** Equipe Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA Brasília, 15 de maio de 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Segurança do paciente em serviços de saúde : limpeza e desinfecção de superfícies.** 2012.

ALMASAUDI, SAAD B. *Acinetobacter spp.* As nosocomial pathogens: **Epidemiology and resistance features.** Saudi Journal of Biological Sciences (2018) 25, 586-596.

ANDRADE, S.S. et al. **Antimicrobial susceptibility of Gram negative bacilli isolate in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2003-2008).** Braz J Infect Dis, v. 12, Suppl 2, p. 3-9, 2008.

ATSUSHI T, Nagamune H, Maeda T, Murakami K, Miyake Y, Kourai H. **Correlation between resistance of Pseudomonas aeruginosa to quaternary ammonium compounds and expression of outer membrane protein OprR.** Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(7):2093-2099. doi:10.1128/aac.47.7.2093-2099.2003

BONAPACE, C. R.; *et al.* **Evaluation of antibiotic synergy against Acinetobacter baumannii: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 38 (2000) 43–50.

BONNIN RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L. **Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in Acinetobacter baumannii.** Antimicrobial Agents Chemotherapy. 2011; 55(1): 349-354. doi:10.1128/AAC.00773-10

BOOST, M. V.; *et al.* **Effect of Multipurpose Solutions against Acinetobacter carrying QAC Genes.** Optometry and Vision Science, volume 91, nº3, março 2014.

BOUZADA, M. L.; *et al.* **Antimicrobial resistance and disinfectants susceptibility of persistent bacteria in a tertiary care hospital.** Journal of Microbiology and Antimicrobials Vol. 2(7), 2010.

CARVALHO KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD. **Dissemination of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil.** Int J Antimicrob Agents. 2009;34(1):25-28. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.12.009

CIESLINSKI, J. M.; *et al.* **Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence-based PCR.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 77 (2013) 337-340. / doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.018.

CHAGAS, T. P. G.; *et al.* **Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008–2011): Countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79).** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease (2014), doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.006

CLARKA, Nina M., George G. Zhanelb, and Joseph P. Lynch IIIc. **Emergence of antimicrobial resistance among *Acinetobacter* species: a global threat.** Curr Opin Crit Care 2016, 22:491–499 DOI:10.1097/MCC.0000000000000337.

CLIMACO, E. C.; *et al.* **Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil.** Infection, Genetics and Evolution 19 (2013) 127-133. / doi: 10.1016/j.meegid.2013.06.024.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2018). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 17th informational supplement (M100-S28).** Wayne, Pennsylvania.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2003). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 6th Edition.** (M7). Wayne, Pennsylvania.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (1999). **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline.** (M26-A). Wayne, Pennsylvania

DALLA-COSTA, L. M.; *et al.* **Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil.** JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July 2003, p. 3403–3406

DANCER, S. J. **The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection.** Journal of Hospital Infection (2009) 73, 378-385.

DANCER, S. J.; *et al.* **Controlling Hospital-Acquired Infection: Focus on the Role of the Environment and New Technologies for Decontamination.** October 2014 Volume 27 Number 4 Clinical Microbiology Reviews p. 665–690. doi:10.1128/CMR.00020-14

DIJKSHOORN, L.; *et al.* **An increasing threat in hospitals:multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** Nature reviews | microbiology volume 5, 2007.

ENOCH, D. A.; *et al.* **Non-fermentative Gram-negative bacteria.** Clinical Microbiology & Public Health Laboratory, International Journal of Antimicrobial Agents 29 Suppl. 3 (2007) S33–S41.

FALAGAS ME, Vardakas KZ, Kapaskelis A, Triarides NA, Roussos NS. **Tetracyclines for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections.** *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(5):455-460. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.12.031

FOURNIER PE, Richet H. **The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities.** *Clin Infect Dis.* 2006;42(5):692-699. doi:10.1086/500202

GALES AC, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. **Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital.** *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;45(1):77-79. doi:10.1016/s0732-8893(02)00500-x

GARCIA, M.R., and Cabo, M.L. (2018) **Optimization of *E. coli* Inactivation by Benzalkonium Chloride Reveals the Importance of Quantifying the Inoculum Effect on Chemical Disinfection.** *Front Microbiol* 9: 1259.

GARNACHO-MONTERO J, Amaya-Villar R, Ferrándiz-Millón C, Díaz-Martín A, López-Sánchez JM, Gutiérrez-Pizarraya A. **Optimum treatment strategies for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia.** *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(6):769-777. doi:10.1586/14787210.2015.1032254

GERBA CP. **Quaternary ammonium biocides: efficacy in application.** *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(2):464-469. doi:10.1128/AEM.02633-14

GILBERT P, MOORE L. E. **Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet.** *Journal of Applied Microbiology* 2005, 99, 703–71.

GOMAA, Fatma Alzahraa M. **High Prevalence of blaNDM-1, blaVIM, qacE, and qacEΔ1 Genes and Their Association with Decreased Susceptibility to Antibiotics and Common Hospital Biocides in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*.** *Microorganisms* 2017, 5, 18; doi: 10.3390/microorganisms5020018

GOULART, V. A. M.; REZENDE, R. **MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do cancer.** Vol. 1, N. 3, 21 de novembro de 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.15729/nanocellnews.2013.11.21.001>

GUIMARÃES, M. A.; *et al.* **Disinfectant and antibiotic activities: a comparative analysis in brazilian hospital bacterial isolates.** *Brazilian Journal of Microbiology* (2000) 31:193-19.

HAMPTON T. **Report Reveals Scope of US Antibiotic Resistance Threat.** *JAMA.* 2013;310(16):1661–1663. doi:10.1001/jama.2013.280695

HANG, H. P. *et al.* **Pharmacology.** 6. ed. Churchill Livingstone, 2007.

HAWKEY, J.; *et al.* **Evolution of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* during a prolonged infection.** *Microbial Genomics* 2018; 4. DOI 10.1099/mgen.0.000165

HIGGINS, P. G.; *et al.* **Molecular Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* Bloodstream Isolates Obtained in the United States from 1995 to 2004 Using repPCR and Multilocus Sequence typing.** *J Clin Microbiol* **50**: 3493-3500.

HO J, Tambyah PA, Paterson DL. **Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective.** *Current Opinion Infectious Diseases.* 2010; 23(6): 546-553. doi:10.1097/QCO.0b013e32833f0d3e

HORAN TC, Andrus M, Dudeck MA. **CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting [published correction appears in *Am J Infect Control.* Am J Infect Control. 2008;36(5):309-332. doi:10.1016/j.ajic.2008.03.002**

HUANG, XIAO-ZHE; *et al.* **Development and validation of a multiplex TaqMan real-time PCR for rapid detection of genes encoding four types of class D carbapenemase in *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Medical Microbiology* (2012), 61, 1532–1537.

JAWAD, A.; *et al.* **Influence of Relative Humidity and Suspending Menstrua on Survival of *Acinetobacter spp.* on Dry Surfaces.** American Society for Microbiology. *Journal Of Clinical Microbiology*, Dec. 1996, p. 2881–2887 Vol. 34, No. 12

JOSHI N, Miller DQ. **Doxycycline revisited.** *Archive of Internal Medicine* 1997;157(13):1421-1428.

KAMOLVIT, W, Sidjabat HE, Paterson DL. **Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance of *Acinetobacter spp.* in Asia and Oceania.** *Microb Drug Resist.* 2015;21(4):424-434. doi:10.1089/mdr.2014.0234

KARAGEORGOPOULOS DE, Falagas ME. **Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections.** *Lancet Infect Dis.* 2008;8(12):751-762. doi:10.1016/S1473-3099(08)70279-2

KARTHIKEYAN K, Thirunarayan MA, Krishnan P. **Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and arma in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India.** *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(10):2253-2254. doi:10.1093/jac/dkq273

KNAUF, G. A.; *et al.* **Exploring the Antimicrobial Action of Quaternary Amines against *Acinetobacter baumannii*.** American Society for Microbiology, 2018 Volume 9 Issue 1. / <https://doi.org/10.1128/mBio.02394-17>.

KO, KS, Suh JY, Kwon KT, et al. **High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea.** *Journal Antimicrobial Chemotherapy.* 2007;60(5):1163-1167. doi:10.1093/jac/dkm305

KOCA, Neriman Aksu. **Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Adult Intensive Care Units: Risk Factors for Colonization and Infection.** *Mediterr J Infect Microb Antimicrob* 2018;7:25

KRAMER, A.; *et al.* **How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review.** *MNC Infectious Diseases*, 2006, 6: 130. / doi: 10.1186/1471-2334-6-130.

LING, M.L., Ching, P., Widadiputra, A., Stewart, A., Sirijindadirat, N., and Thu, L.T.A. (2018) **APSID guidelines for disinfection and sterilization of instruments in health care facilities.** *Antimicrob Resist Infect Control* 7: 25.

LIU, W. J.; *et al.* **Frequency of antiseptic resistance genes and reduced susceptibility to biocides in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Medical Microbiology* 2017; 66:13–17 DOI 10.1099/jmm.0.000403.

MAHZOUNIEH, M., Khoshnood, S., Ebrahimi, A., Habibian, S., and Yaghoubian, M. (2014) **Detection of Antiseptic-Resistance Genes in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* spp. Isolated From Burn Patients.** *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 9: e15402.

MANCHANDA V, Sanchaita S, Singh N. **Multidrug resistant acinetobacter.** *J Glob Infect Dis.* 2010;2(3):291-304. doi:10.4103/0974-777X.68538

MARAGAKIS, L. L.; *et al.* ***Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options.** *Clinical Infectious Diseases* 2008;46:1254–63 / DOI: 10.1086/529198

MARTRO´A, E.; *et al.* **Assessment of *Acinetobacter baumannii* susceptibility to antiseptics and disinfectants.** *Journal of Hospital Infection* (2003) 55, 39–46.

MCDONNELL, G.; Russell, D. **Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance.** *Clin. Microbiol. Rev.*,12: 147-179, 1999.

MEYERA, B.; COOKSON, B. **Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control?** *Journal of Hospital Infection* – 2010.

MENCACCI, A.; *et al.* **Typing of Nosocomial Outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry.** *Journal of Clinical Microbiology*, Volume 51, p. 603-606. Rome, Italy, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). **Portaria nº 2616 de 13 de maio de 1998. Regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país.** *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 15 maio 1998. Seção I.

MISBAH, S.; *et al.* **Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing.** *Singapore Medical Journal*, 2005; 46(9):461; Malaysia.

MOEN, B., Rudi, K., Bore, E., and Langsrud, S. (2012) **Subminimal inhibitory concentrations of the disinfectant benzalkonium chloride select for a tolerant subpopulation of *Escherichia coli* with inheritable characteristics.** *Int J Mol Sci* 13: 4101-4123.

MUNOZ-PRICE, SILVIA L.; WEINSTEIN, ROBERT A. **Acinetobacter Infection**. The New England Journal of Medicine, 2008;358:1271-81.

NAAS T, Namdari F, Réglie-Poupet H, Poyart C, Nordmann P. **Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing Acinetobacter baumannii from New York City**. J Antimicrob Chemother. 2007;60(5):1174-1176. doi:10.1093/jac/dkm366

NOWAK J, Seifert H, Higgins PG. **Prevalence of eight resistance-nodulation-division efflux pump genes in epidemiologically characterized Acinetobacter baumannii of worldwide origin**. Journal Medical Microbiology. 2015;64(6):630-635. doi:10.1099/jmm.0.000069

PATEL, R. V.; *et al.* **Acinetobacter infections: a retrospective study to determine in-hospital mortality rate and clinical factors associated with mortality**. Infection Prevention in Practice 1 (2019).

PATERSON, D. L.; *et al.* **New treatment options for multiresistant gram negatives**. Current Opinion in Infectious Diseases 2020, 33:214–223 DOI: 10.1097/QCO.0000000000000627.

PATON, R., Miles, R.S., Hood, J., Amyes, S.G., Miles, R.S., and Amyes, S.G. (1993) **ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in Acinetobacter baumannii**. *Int J Antimicrob Agents* 2: 81-87.

PAULSEN IT, Littlejohn TG, Radstrom P, Sundstrom L, Skold O, Swedberg G, et al. **The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1993;37(4):761–8.

PELEG, A. Y.; *et al.* **Acinetobacter baumannii: Emergence of a Successful Pathogen**. Clinical microbiology reviews, July 2008, p. 538–582.

PEREIRA MS, Souza ACS, Tipple AFV, Prado MA. **Hospital infection and its implications to the nursing care**. Texto Contexto Enferm 2005 Abr-Jun; 14(2):250-7.

PILLONETTO M, Arend L, Vespero EC, et al. **First report of NDM-1-producing Acinetobacter baumannii sequence type 25 in Brazil**. Antimicrobial Agents of Chemotherapy. 2014;58(12):7592-7594. doi:10.1128/AAC.03444-14

POIREL, L. and P. Nordmann. **Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Beta-Lactamases and their Genetic Support**. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2002, 3, 117-127

POTRON A, Munoz-Price LS, Nordmann P, Cleary T, Poirel L. **Genetic features of CTX-M-15-producing Acinetobacter baumannii from Haiti**. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(12):5946-5948. doi:10.1128/AAC.05124-11

RANJBAR, R., and Farahani, A. (2019) **Study of genetic diversity, biofilm formation, and detection of Carbapenemase, MBL, ESBL, and tetracycline resistance genes in**

**multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wound infections in Iran.** *Antimicrob Resist Infect Control* **8**: 172.

ROBLEDO, I.E. et al. **Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. In Puerto Rico.** *Antimicrob Agents Chemother*, v. 54, n. 3, p. 1354-7, 2010.

RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, J.M. et al. **Extended-Spectrum Cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrob Agents Chemother*, v. 54, n. 8, p. 3484-8, 2010

RUTALA, W. A.; et al. **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities.** Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), 2008.

SESA/DAV/CVIS, 2019. **Boletim epidemiológico das iras (SONIH).** Comissão estadual de controle de infecção em serviços de saúde. Governo do Estado do Paraná. Disponível em: [www.saude.pr.gov.br-visa@sesa.pr.gov.br](http://www.saude.pr.gov.br-visa@sesa.pr.gov.br)

SCHNEIDERS, T.; et al. **Efflux Pumps in *Acinetobacter baumannii*.** *Acinetobacter Biology and Pathogenesis*, 2008. DOI: 10.1007/978-0-387-77944-7\_6.

SHAFATI, M.; et al. **Correlation Between *qacE* and *qacE*□1 Efflux Pump Genes, Antibiotic and Disinfectant Resistant Among Clinical Isolates of *E.coli*.** *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 2016, 11, 000-000.

SINGH A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. **Application of molecular techniques to the study of hospital infection.** *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):512-530. doi:10.1128/CMR.00025-05

SLAMA TG. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care*. 2008;12 Suppl 4(Suppl 4):S4. doi:10.1186/cc6820

TOMARAS, A. P., C. W. Dorsey, R. E. Edelman, and L. A. Actis. 2003. **Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system.** *Microbiology* 149:3473–3484.

TUON, F.F., Rymza, A.M., Penteado-Filho, S.R., Pilonetto, M., Arend, L.N., and Levin, A.S. (2011) **Should polymyxin be used empirically to treat infections in patients under high risk for carbapenem-resistant *Acinetobacter*?** *J Infect* **62**: 246-249.

TURTON, JANE F.; et al. **Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla<sub>oxa-51-like</sub> Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species.** *Journal of Clinical Microbiology*, Londres 2006, p.2974-2976. Doi:10.1128/JCM.01021-06

VIJAYAKUMAR, R.; et al. **Distribution of biocide resistant genes and biocides susceptibility in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* – A first report from the kingdom of Saudi Arabia.** *Journal of Infection and Public Health*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.05.011>

VILLEGAS, M.V., and Hartstein, A.I. (2003) **Acinetobacter outbreaks, 1977-2000.** *Infect Control Hosp Epidemiol* **24**: 284-295.

VINCENT JL, Rello J, Marshall J, et al. **International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units.** *JAMA.* 2009;302(21):2323-2329. doi:10.1001/jama.2009.1754

WAND M.E. (2017) **Bacterial Resistance to Hospital Disinfection.** In: Hurst C. (eds) *Modeling the Transmission and Prevention of Infectious Disease. Advances in Environmental Microbiology*, vol 4. Springer, Cham

WANG, C.; ZHAN, Q.; MI, Z.; HUANG, Z.; CHEN, G. **Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEΔ1* in 331 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in China.** *Journal Hospital Infectious* 2007, 66, 93–95.

WANG, C., Zhan, Q., Mi, Z., Huang, Z., and Chen, G. (2008) **Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEΔ1* in 283 clinical isolates of Gram-negative bacteria in China.** *J Hosp Infect* **69**: 394-396.

WIEGAND, IRITH; *et al.* **Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances.** *Nature Protocols*, volume 03 n°02, 2008. (doi:10.1038/nprot.2007.521)

WOODFORD, NEIL; *et al.* **Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.*** *International Journal of Antimicrobial Agents* 27: 351-353, Londres, 2006.

WU X, Wang L, Ye YZ, Yu H. **Postoperative multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis successfully treated with intravenous doxycycline and intraventricular gentamicin: A case report.** *World J Clin Cases.* 2019;7(24):4342-4348. doi:10.12998/wjcc.v7.i24.4342

YONG D, Shin JH, Kim S, et al. **High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter spp.* in Korea.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(5):1749-1751. doi:10.1128/aac.47.5.1749-1751.2003

ZARRILLI, R.; *et al.* **Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy.** *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; Clinical Microbiology Infectious* 2007; 13: 481–489.

ZMANTAR, T., Kouidhi, B., Miladi, H., and Bakhrouf, A. (2011) **Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci.** *BMC Res Notes* **4**: 453.

ZHAO, S.; *et al.* **An investigation of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a comprehensive hospital of East China.** *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* (2015) 14:7

ZUSMAN O, Altunin S, Koppel F, Dishon Benattar Y, Gedik H, Paul M. **Polymyxin monotherapy or in combination against carbapenem-resistant bacteria: systematic review and meta-analysis.** J Antimicrob Chemother. 2017;72(1):29-39. doi:10.1093/jac/dkw377