



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas


Beathriz Godoy Vilela Barbosa

**Bacilos Gram-negativos no ambiente de uma unidade de terapia  
intensiva: ocorrência, resistência a antimicrobianos e análise  
molecular**

Rio de Janeiro  
2015

Beatriz Godoy Vilela Barbosa

**Bacilos Gram-negativos no ambiente de uma unidade de terapia intensiva:  
ocorrência, resistência a antimicrobianos e análise molecular**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B238 Barbosa, Beathriz Godoy Vilela.  
Bacilos Gram-negativos no ambiente de uma unidade de terapia intensiva: ocorrência, resistência a antimicrobianos e análise molecular / Beathriz Godoy Vilela Barbosa. – 2015.  
152 f.

Orientadora: Elizabeth de Andrade Marques.

Coorientadora: Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Infecção hospitalar - Teses. 2. Acinetobacter - Patogenicidade. 3. Infecções bacterianas gram-negativas - Transmissão. 4. Resistência Microbiana a Medicamentos. 5. Testes de Sensibilidade Microbiana. I. Marques, Elizabeth de Andrade. II. Carvalho-Assef, Ana Paula D'Alincourt. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-022.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Beatriz Godoy Vilela Barbosa

**Bacilos Gram-negativos no ambiente de uma unidade de terapia intensiva:  
ocorrência, resistência a antimicrobianos e análise molecular**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 30 de março de 2015.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Elizabeth de Andrade Marques  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof. Dr. Sérgio da Cunha  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Mara Lúcia Penna Queiroz  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Dra. Rachel Leite Ribeiro  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais e meus avós, razões de eu ter chegado até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rita e Cláudio, por todo o amor, o apoio e por terem me dado o discernimento para escolher meus caminhos com responsabilidade e para reconhecer e aproveitar as oportunidades (ou boa parte delas) que Deus coloca diante de mim.

À minha família, alicerce da minha caminhada, sempre mostrando a importância da união e do amor. Aos mais chegados, um agradecimento especial: Luísa, Ellen, Iaiá, Tia Pepa e meus avós queridos: Lucy, Guido, Pedro e Olívia (*in memoriam*).

Aos amigos de Recife, que não deixaram a distância ou as novas atribuições sequer diminuir o imenso carinho que cultivamos: Ridan, Ilka, Julliana, Carol Zefa, Guga, Tati, Robson e André.

Aos eternos cromossomais do LRM: Carol, Marinalda, Felipe e Márcia, pelo companheirismo e amizade.

A todos que me receberam aqui no Rio de Janeiro e que, de alguma forma, fizeram parte da minha vida, seja na capoeira e no coral UERJ, nos forrós do centro ou na companhia diária. Com um carinho particular a minha “irmã carioca” Juliana, Marlon, Rosana, Renata, Patrícia, Guilherme e Sandra, pela amizade que eu sei que seguirá, apesar da distância.

Aos companheiros do Lab.2, atuais e passados, pelas horas de trabalho e lazer, e pela ajuda em todas as etapas da minha passagem pela pós-graduação. Agradeço sobretudo a Elenice, pela amizade, e ao prof<sup>o</sup> Robson, pelos conselhos e risadas. Também dedico um agradecimento mais que especial a Márcia Jones, pela dedicação e paixão pela microbiologia e, principalmente, por tudo o que me ensinou.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ, por me receberem tão bem e pela disponibilidade para ajudar sempre que preciso e pelas conversas descontraídas no café. Com carinho, agradeço a Manu, Denílson, Lurdinha, Carla e Jorge.

À equipe do laboratório de bacteriologia do HUPE (LABAC), pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pelo acolhimento ao longo de todos esses anos.

A toda a equipe do CTI Geral do HUPE, em especial ao Profº Sérgio da Cunha e à Enfª Leni Assis, pela colaboração que vem desde o mestrado e que foi tão importante, não apenas para a realização desse trabalho, mas para a minha formação como profissional.

À Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do HUPE, por estar sempre acessível e disposta a ajudar em diversas etapas deste trabalho, pelas discussões e pelo interesse. Em especial ao amigo Julio Correal, pelas discussões e pelas análises estatísticas desse trabalho.

Ao profº Rodolpho Albano e a Denise, pela colaboração na realização dos sequenciamentos e análises dos resultados.

A Drª Maria Del Mar Tomás, Mariki, por me receber com tanto carinho em um laboratório novo, em um país novo e por acreditar no meu trabalho. A ela e a todos os integrantes do grupo de pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário A Coruña (CHUAC) e do Instituto de Investigação Biomédica de A Coruña (INIBIC): Dr. Germán Bou, María, Miriam, Marta, Eva, Patri, Clara, Carlos, Alex, Juan, Marga, Meri e Laura, meus sinceros agradecimentos pelo acolhimento e por tudo o que me ensinaram.

Ao Dr. Felipe Fernández-Cuenca, do Hospital Universitário Virgem de Macarena, em Sevilha- Espanha, pela colaboração na execução das concentrações inibitórias mínimas para antimicrobianos e metais pesados.

A toda a família Vierna Fernández: Patrícia, Manuel, Sara, María, Juaco e Cris, por me acolherem e me fazerem sentir em casa, do outro lado do oceano. Em especial a Sara, pelas conversas, passeios e por me emprestar seus amigos e sua família!

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida para execução desse trabalho e, especialmente, pela concessão da bolsa do Programa Doutorado Sanduíche no Exterior, que me permitiu ampliar meus conhecimentos científicos e sociais, dentro do “universo acadêmico”.

À Profª Ana Paula Carvalho-Assef, pela sua importante contribuição como co-orientadora.

Por fim, um agradecimento especial à Profª Beth, por ter me acolhido como orientanda durante todos esses anos, pelo apoio, pelos conselhos e pela determinação.

## RESUMO

BARBOSA, Beathriz Godoy Vilela. **Bacilos Gram-negativos no ambiente de uma unidade de terapia intensiva: ocorrência, resistência a antimicrobianos e análise molecular.** 2015. 152 f. Tese Doutorado (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A contaminação de superfícies e do ar no ambiente hospitalar está associada à transmissão de patógenos multirresistentes (MDR)- em especial, bacilos Gram-negativos (BGN) produtores de carbapenemases- representando um obstáculo no tratamento e controle de infecções. Este estudo avaliou a ocorrência, sensibilidade a antimicrobianos e a presença de genes de resistência em amostras de BGN isoladas do ambiente do CTI de um hospital universitário. Entre janeiro e julho de 2012, foram realizadas seis coletas de ar e de superfícies em pontos selecionados do ambiente. As amostras de BGN isoladas foram identificadas por métodos fenotípicos e moleculares. O perfil de sensibilidade a antimicrobianos foi determinado por disco-difusão e os genes de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (TEM, CTX) e carbapenemases (OXA e KPC) foram pesquisados por PCR. No ar predominaram bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF), destacando-se cepas de *Acinetobacter baumannii* produtoras de OXA-51 e OXA-23. Dentre as enterobactérias, foram encontradas *Klebsiella pneumoniae* e Complexo *Enterobacter cloacae* (CEC) produtores de KPC e/ou ESBL. Nas superfícies, o número de BGNNF e enterobactérias foi equivalente, com ocorrência de *A. baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* MDR, além de *K. pneumoniae* e CEC produtores de KPC e ESBLs. O genoma de uma amostra de *Acinetobacter* não-*baumannii* (Anb) isolada do ar, sensível a antimicrobianos e portadora do gene *bla*<sub>OXA-58</sub> foi sequenciado. Verificou-se a presença de genes de resistência a antimicrobianos e metais pesados, e genes relacionados a virulência, persistência e elementos móveis, que podem ter contribuído para sua sobrevivência no ambiente hospitalar, podendo atuar como reservatório de determinantes de resistência. O fenótipo de resistência a antimicrobianos e metais foi determinado por microdiluição e diluição seriada em placa. A cepa foi resistente a arsênio (CIM $\geq$  2048 $\mu$ g/mL) e cobre (CIM= 256 $\mu$ g/mL), indicando uma elevada exposição a esses metais na sua origem ambiental. Os métodos utilizados para identificação (ANI, snpTree e MALDI-TOF MS) desta cepa indicaram tratar-se de uma nova espécie de *Acinetobacter*. A presença de microorganismos MDR no ambiente alerta para a importância das vias de transmissão aérea e por contaminação de superfícies no controle de infecções hospitalares. O conhecimento de espécies de Anb é importante, pois revela fontes de genes de resistência e ajuda a elucidar as características desse gênero, dentro e fora do hospital.

Palavras-chave: Ambiente hospitalar. Bacilos Gram-negativos multirresistentes. *Acinetobacter* não-*baumannii*. Resistência a antimicrobianos. Resistência a metais pesados.



## ABSTRACT

BARBOSA, Beathriz Godoy Vilela. **Gram-negative bacilli in an intensive care unit's environment: occurrence, resistance to antimicrobial compounds and molecular analysis.** 2015. 152 f. Tese Doutorado (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Contamination of the surfaces and the air from hospital environment is related to multiresistant (MDR) pathogens transmission, specially Gram-negative bacteria producing carbapenemases, which represents an obstacle to the treatment and control of infections. This study evaluated the occurrence, the susceptibility to antimicrobial compounds and the presence of resistance genes from Gram-negative bacilli (GNB) isolated from the ICU of a university hospital. Between January and July of 2012, six air and surfaces samplings were conducted at selected sites from the ICU's environment. The GNB samples were identified through phenotypic and molecular techniques, Antibiotic susceptibility was determined by disc diffusion and the presence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genes (TEM, CTX) and carbapenemases genes (OXA, KPC) was studied by PCR. Non fermenters Gram-negative bacilli (NFGNB) were predominant at the air samples, notably occurring OXA-51 and OXA-23 *Acinetobacter baumannii* producers. KPC and ESBL positive *K. pneumoniae* and ESBL positive *K. pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* Complex (ECC) were also isolated from the ICU air. The number of NFGNB and enterobacteria isolated from the surfaces was similar, with the presence of both *A. baumannii* and *P. aeruginosa* MDR, as well as KPC and ESBL producers *K. pneumoniae* and ECC. The genome of an airborne and antibiotic susceptible *Acinetobacter non-baumannii* (Anb) carrying *bla*<sub>OXA-58</sub> was sequenced. Several genes related to antibiotics and heavy metals resistance, virulence, persistence and mobile elements were found that may have contributed to its survival at the hospital environment, where this strain may be acting as a resistance reservoir. Microdilution for antibiotics and metals was performed and the strain was resistant only to arsenic (MIC $\geq$  2048 $\mu$ g/mL) and copper (MIC= 256 $\mu$ g/mL). The methodologies applied for identification of species through genome comparison and proteins profile (ANI, snpTree e MALDI-TOF MS) indicated that this strain represents a new species of *Acinetobacter*. The presence of MDR microorganisms at the hospital environment points out to the relevance of surface contamination and air transmission for infection control. The knowledge about Anb is highly important, as it may reveal resistance genes reservoirs and helps to elucidate resistance genes, inside and outside of the hospital environment.

Keywords: Hospital environment. Gram-negative bacilli. *Acinetobacter non-baumannii*. Antimicrobial resistance. Heavy metals resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Planta baixa do CTI Geral do HUPE em 2012.....	43
Figura 2 –	Aparelho de coleta de ar MAS-100 <i>air sampler</i> (Merck).....	46
Quadro 1 –	Discos de antimicrobianos testados para grupo de micro-organismos estudado.....	54
Figura 3 –	Esquema para aplicação de discos de antimicrobianos para detecção de carbapenemases em enterobactérias.....	55
Figura 4 –	Crescimento microbiano em placa de ágar sangue representativa da coleta de ar do CTI Geral do HUPE.....	68
Gráfico 1 –	Percentual de amostras de enterobactérias com resistência intermediária ou plena aos antimicrobianos testados.....	82
Gráfico 2 –	Percentual de amostras de <i>K. pneumoniae</i> e Complexo <i>E. cloacae</i> com resistência intermediária ou plena aos antimicrobianos testados.....	83
Gráfico 3 –	Percentual de amostras de <i>A. baumannii</i> isoladas de ar e superfícies com resistência intermediária ou plena aos antimicrobianos.....	91
Gráfico 4 –	Percentual de amostras de <i>Acinetobacter</i> spp. isoladas de ar ou das superfícies com resistência intermediária ou plena aos antimicrobianos.....	93
Figura 5 –	Lista e representação gráfica dos subsistemas caracterizados pelo RAST, número de proteínas anotadas e percentual de proteínas classificadas em subsistemas.....	95
Figura 6 –	Dendrograma dos espectros gerados pelo MALDI-TOF MS para cepas de diversas espécies do gênero <i>Acinetobacter</i> .....	96
Figura 7 –	Dendrograma representativo da relação filogenética entre espécies de <i>Acinetobacter</i> , baseado na comparação de SNPs entre genomas.....	98

Figura 8 –	Representação circular da comparação de três genomas de <i>Acinetobacter</i> spp., em relação ao genoma da cepa <i>Acinetobacter</i> sp. 5-2Ac02. As regiões em branco representam inserções/ deleções nos genomas .....	99
Figura 9 –	Representação da região entre os pares de base 20.847 e 28.383 do <i>contig</i> de 29.664pb, do genoma da cepa <i>Acinetobacter</i> sp. 5-2Ac02, que contém os genes <i>bla<sub>OXA-58</sub></i> , <i>tetA(39)</i> e <i>tetR(39)</i> .	102
Figura10 –	Representação da região entre os pares de base 6.556 e 11.652 do <i>contig</i> de 11.698pb do genoma da cepa <i>Acinetobacter</i> sp. 5-2Ac02, que contém o <i>operon ars</i> e parte da sequência de inserção <i>ISAb16</i> .....	104
Figura 11 –	Representação da região entre os pares de base 1.102 e 4.998 do <i>contig</i> de 5.259pb, do genoma da cepa <i>Acinetobacter</i> sp. 5-2Ac02, que contém um <i>operon ars</i> com os genes <i>ACR3</i> , <i>arsR</i> e <i>arsC</i> .....	105
Figura 12 –	Representação da região entre os pares de base 48 e 4.384 do <i>contig</i> de 5.306pb, do genoma da cepa <i>Acinetobacter</i> sp. 5-2Ac02, que contém o <i>operon kilA</i> .....	106
Figura 13 –	Representação da região entre os pares de base 6 e 2.414 do <i>contig</i> de 3.022pb, do genoma da cepa <i>Acinetobacter</i> sp. 5-2Ac02, que contém o gene <i>tehB</i> .....	
Figura 14 –	Profago incompleto identificado pelo PHAST no genoma da cepa <i>Acinetobacter</i> sp. 5-2Ac02. As setas azuis representam proteínas hipotéticas e as setas alaranjadas referem-se uma proteína portal e outras proteínas fágicas .....	107 111

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos pontos e sítios de coleta do ar e das superfícies do CTI Geral do HUPE.....	44
Tabela 2 -	Relação dos iniciadores utilizados para detecção dos genes de oxacilinas em <i>Acinetobacter</i> spp. ....	58
Tabela 3 -	Relação dos iniciadores utilizados para detecção dos genes de ESBL e KPC no DNA genômico das enterobactérias.....	59
Tabela 4 -	Condições de ciclagem das reações para detecção de ESBLs e KPC.....	60
Tabela 5 -	Sais de metais utilizados para microdiluição em caldo e diluição seriada em placa.....	687
Tabela 6 -	Contagem total de colônias obtidas nas placas de ágar sangue a partir das coletas de ar ao longo das seis coletas no CTI Geral.....	69
Tabela 7 -	Distribuição das amostras de BGN isoladas a partir da coleta do ar e das superfícies do CTI Geral.....	70
Tabela 8 -	Espécies de BGNNF identificadas a partir das coletas de ar e superfícies do CTI Geral do HUPE.....	71
Tabela 9 -	Espécies de Enterobactérias identificadas a partir das coletas de ar e superfícies do CTI Geral do HUPE.....	72
Tabela 10 -	Distribuição das amostras de BGN isoladas a partir da coleta das superfícies do CTI Geral.....	73
Tabela 11 -	Distribuição das amostras de BGN, número de <i>swabs</i> coletados e relação entre o número de <i>swabs</i> e o número de amostras em cada sítio de coleta de superfícies do CTI Geral.....	74
Tabela 12 -	Amostras de BGN isoladas a partir dos Carrinhos de enfermagem de cada leito ao longo de seis meses de coleta.....	75
Tabela 13 -	Distribuição das amostras de BGNNF isoladas a partir da coleta dos respiradores do CTI Geral.....	76

Tabela 14 - Distribuição das espécies de BGN isoladas a partir da coleta das bombas infusoras no CTI Geral.....	76
Tabela 15- Distribuição das espécies de BGN isoladas a partir da coleta das pias do posto de enfermagem do CTI Geral.....	78
Tabela 16 - Distribuição das amostras de BGN isoladas a partir da coleta do ar do CTI Geral.....	78
Tabela 17 - Distribuição das espécies de BGN isoladas a partir da coleta do ar do CTI Geral.....	79
Tabela 18 - Distribuição das espécies de enterobactérias isoladas do ambiente do CTI Geral.....	81
Tabela 19 - Perfis de resistência de amostras de enterobactérias, isoladas a partir do ar e de superfícies.....	85
Tabela 20 - Perfil fenotípico e molecular de enterobactérias MDR isoladas a partir dos diversos pontos de coleta.....	87
Tabela 21 - Distribuição das espécies do gênero <i>Pseudomonas</i> isoladas a partir da coleta do ambiente do CTI Geral nos diversos sítios de coleta.....	88
Tabela 22 - Distribuição das espécies do gênero <i>Pseudomonas</i> isoladas a partir da coleta do ambiente do CTI Geral ao longo dos meses...	89
Tabela 23 - Perfis de resistência de amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas a partir do ar ou de superfícies.....	89
Tabela 24 - Perfis de resistência de amostras de <i>Acinetobacter</i> spp. isoladas a partir do ar ou de superfícies.....	92
Tabela 25 - Resultados da comparação da identidade média de nucleotídeos (ANI) entre genomas.....	97
Tabela 26 - Concentração inibitória mínima e categoria de susceptibilidade a antimicrobianos e metais pesados para a cepa <i>Acinetobacter</i> sp. 5-2Ac02.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AbRC	<i>Acinetobacter baumannii</i> Resistente aos Carbapenêmicos
AMC	Amoxicilina com ácido clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
Anb	<i>Acinetobacter não-baumannii</i>
ANI	<i>Average Nucleotide Identity</i>
As(III)	Arsenito
As(V)	Arsenato
ATM	Aztreonam
BGN	Bacilo Gram-negativo
BGNNF	Bacilo Gram-negativo Não Fermentador
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
Cab	Complexo <i>Acinetobacter baumannii</i>
CAZ	Ceftazidima
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CEC	Complexo <i>Enterobacter cloacae</i>
CEF	Cefalotina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLED	Ágar Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CPM	Cefepime
CTI	Centro de Terapia Intensiva
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxima
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
ERC	Enterobactéria Resistente a Carbapenêmicos
ERT	Ertapenem
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i>
GEN	Gentamicina

HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IMI	Imipenem
IrAS	Infecções relacionadas à Assistência à Saúde
IS	<i>Insertion sequence</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
MBL	Metalo-beta-lactamase
MDR	<i>Multidrug resistant</i>
MER	Meropenem
MRSA	<i>Methicillin- Resistant Staphylococcus aureus</i>
MSP	<i>Main spectrum dendrogram</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OXA	Oxacilinase
PAS	Profissionais da assistência em Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
PHAST	<i>Phage Search Tool</i>
PPT	Piperacilina-tazobactam
RAST	<i>Rapid Annotations using Subsystems Technology</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SAM	Ampicilina-sulbactam
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SUT	Sulfametoxazol com trimetoprim
TADB	<i>Toxin Antitoxin Data Base</i>
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
VRE	<i>Vancomycin Resistant Enterococcus</i>

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>CARBAPENEMASES</b> .....	18
2	<b>AMBIENTE HOSPITALAR</b> .....	20
3	<b>LIMPEZA E DESINFECÇÃO</b> .....	22
4	<b>VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO AMBIENTE HOSPITALAR</b>	25
5	<b>ENTEROBACTÉRIAS</b> .....	27
6	<b><i>PSEUDOMONAS</i> spp.</b> ....	28
7	<b><i>ACINETOBACTER</i> spp.</b> ....	30
8	<b>RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS</b> .....	34
9	<b>SEQUENCIAMENTO DE GENOMAS</b> .....	38
10	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	40
11	<b>OBJETIVOS</b> .....	41
11.1	<b>Objetivo geral</b> .....	41
11.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	41
12	<b>METODOLOGIA</b> .....	42
12.1	<b>Coleta de amostras ambientais</b> .....	42
12.1.1	<u>Superfícies</u> .....	44
12.1.2	<u>Ar</u> .....	45
12.2	<b>Intervenção</b> .....	46
12.3	<b>Análise estatística</b> .....	47
12.4	<b>Seleção de amostras bacterianas</b> .....	47
12.5	<b>Identificação bacteriana</b> .....	48
12.6	<b>Teste de sensibilidade a antimicrobianos</b> .....	53
12.7	<b>Detecção fenotípica de carbapenemases em enterobactérias</b>	54
12.8	<b>Detecção molecular de genes de resistência</b> .....	56
12.8.1	<u>PCR multiplex para detecção de Oxacilinases</u> .....	57
12.8.2	<u>PCR para detecção de ESBLs e KPC</u> .....	58
12.8.3	<u>PCR do gene <i>rpoB</i></u> .....	60
12.9	<b>Purificação do DNA</b> .....	61
12.10	<b>Sequenciamento dos genes <i>bla</i><sub>OXA-58</sub> e <i>rpoB</i></b> .....	61



12.10.1	<u>Análise das sequências dos genes <i>rpoB</i> e <i>bla<sub>OXA-58</sub></i>.....</u>	62
12.11	<b>Identificação da espécie por espectrometria de massa pelo tempo de voo e desorção/ionização a laser assistida por matriz – MALDI-TOF MS.....</b>	62
12.12	<b>Sequenciamento do genoma de <i>Acinetobacter</i> não-<i>baumannii</i>.....</b>	63
12.12.1	<u>Identidade média de nucleotídeos (ANI).....</u>	64
12.12.2	<u>Filogenia baseada em Polimorfismos de Nucleotídeo Único.....</u>	65
12.12.3	<u>Análise do Genoma.....</u>	65
12.13	<b>Determinação da concentração inibitória mínima para antimicrobianos e metais pesados.....</b>	66
13	<b>RESULTADOS.....</b>	68
13.1	<b>Contagem de colônias da coleta de ar.....</b>	68
13.2	<b>Identificação fenotípica.....</b>	70
13.3	<b>Distribuição por ponto de coleta.....</b>	73
13.3.1	<u>Superfícies.....</u>	73
13.3.1.1	Carrinhos de enfermagem.....	74
13.3.1.2	Respiradores.....	75
13.3.1.3	Bombas infusoras.....	76
13.3.1.4	Pias.....	77
13.3.2	<u>Ar.....</u>	78
13.4	<b>Enterobactérias.....</b>	80
13.5	<b><i>Pseudomonas</i> spp. ....</b>	87
13.6	<b><i>Acinetobacter</i> spp.....</b>	90
13.6.1	<u>Sequenciamento do genoma de <i>Acinetobacter</i> sp. 5-2Ac02.....</u>	94
13.6.1.1	Identificação de <i>Acinetobacter</i> sp. 5-2Ac02.....	95
13.6.1.2	Subsistemas: Virulência, patogenicidade e defesa/ Transporte de membrana.....	100
13.6.1.2.1	Resistência a antimicrobianos.....	100
13.6.1.2.2	Resistência a metais pesados.....	103
13.6.1.2.3	Virulência.....	108
13.6.1.2.4	Transporte de membrana.....	109

13.6.1.3	Regulação e sinalização celular/ Dormência e esporulação/ Resposta ao estresse.....	109
13.6.1.4	Fagos, Profagos, Elementos transponíveis e Plasmídeos.....	110
14	<b>DISCUSSÃO</b> .....	112
14.1	<b>Coletas de superfícies</b> .....	112
14.2	<b>Coletas de ar</b> .....	115
14.3	<b><i>Acinetobacter</i> sp. 5-2Ac02</b> .....	118
14.3.1	<u>Resistoma</u> .....	119
14.3.2	<u>Mobiloma</u> .....	125
14.3.3	<u>Persistoma</u> .....	126
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	131
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	133
	APÊNDICE A.....	145
	APÊNDICE B.....	146

## INTRODUÇÃO

Na última década tem sido verificado o aumento da incidência de infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes (BGN-MDR), incluindo várias espécies de enterobactérias e Bacilos Gram-negativos Não fermentadores (BGNNF), especialmente *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Uma vez que esses micro-organismos estão associados a infecções graves, consistem em um sério problema de saúde pública em diversos países (Magiorakos *et al.*, 2012; Fariñas e Martínez-Martínez, 2013). Infecções causadas por BGN-MDR estão associadas a taxas de mortalidade até 21% maiores do que aquelas associadas a BGN sensíveis e resultam em hospitalizações prolongadas e custos elevados (Lautenbach *et al.*, 2010; Mattner *et al.*, 2012).

O aumento da resistência bacteriana aliado ao baixo número de novas drogas ativas contra bactérias Gram-negativas em desenvolvimento pelas indústrias farmacêuticas faz com que haja cada vez menos opções terapêuticas para infecções graves causadas por esses micro-organismos (Magiorakos *et al.*, 2012; Fariñas e Martínez-Martínez, 2013). O impacto do isolamento de bactérias multirresistentes (MDR) estende-se a todos os aspectos da medicina e ameaça o progresso alcançado em áreas como transplante, cirurgias e oncologia (van Duin *et al.*, 2013). A produção de carbapenemases, enzimas que hidrolisam os carbapenêmicos, representa um problema grave para o tratamento das Infecções relacionadas à Assistência em Saúde (IrAS), uma vez que este é o principal grupo de escolha para infecções graves por micro-organismos Gram-negativos (Mattner *et al.*, 2012).

## 1 CARBAPENEMASES

As enzimas com atividade de carbapenemase mais encontradas em BGN pertencem às classes A, B e D de Ambler. A principal enzima de classe A é a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), já descrita em diversas espécies de enterobactérias e em não fermentadores, como *P. aeruginosa* (Villegas *et al.*, 2007) e *A. baumannii* (Robledo *et al.*, 2010). As enzimas de classe B, ou metalo- $\beta$ -lactamases (MBL) incluem IMP, VIM e SPM, e são encontradas principalmente em *Pseudomonas* spp., embora tenha havido uma disseminação desses genes entre as enterobactérias (Livermore e Woodford, 2006; Miriagou *et al.*, 2010; Livermore, 2012). A enzima New Delhi Metalo- $\beta$ -lactamase (NDM), mais recentemente descrita, foi inicialmente encontrada em enterobactérias e se disseminou rapidamente entre diversas espécies bacterianas. Essa enzima já foi descrita em *Acinetobacter* spp. clínicos e ambientais e, mais raramente, em *P. aeruginosa* (Nordmann *et al.*, 2011; Dortet, Poirel e Nordmann, 2014; Pagano *et al.*, 2015). As enzimas de classe D, conhecidas como oxacilinases, são mais frequentemente observadas em *Acinetobacter* spp. (OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143) (Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Poirel, Naas e Nordmann, 2010). Já para enterobactérias, a oxacilinase mais comum é a OXA-48 (Livermore e Woodford, 2006; Miriagou *et al.*, 2010; Poirel, Potron e Nordmann, 2012).

A detecção de micro-organismos nos laboratórios de microbiologia clínica é da maior importância na escolha da conduta terapêutica e na implementação de medidas de controle de infecção adequadas. Para amostras clínicas de BGN, a sensibilidade diminuída a um dos carbapenêmicos (imipenem, meropenem ou ertapenem) no teste de difusão em ágar é suficiente para justificar a pesquisa de carbapenemases através de métodos mais específicos (Miriagou *et al.*, 2010). A detecção fenotípica da produção de enzimas carbapenemases tem sido recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para enterobactérias desde março de 2013. Entretanto, esse teste não apresenta sensibilidade e especificidade suficientes para todas as enzimas descritas.

A comprovação molecular da presença de carbapenemases deve ser feita através da amplificação dos genes pela técnica de reação em cadeia da polimerase

(*Polymerase chain reaction*- PCR) e, em alguns casos, sequenciamento. Essas técnicas, principalmente o sequenciamento, não fazem parte da rotina diagnóstica de muitos laboratórios clínicos, sendo mais frequentes nos laboratórios de referência e de pesquisa (Mattner *et al.*, 2012; Nordmann e Poirel, 2012).

## 2 AMBIENTE HOSPITALAR

Ao longo da última década, muitas evidências científicas foram acumuladas a respeito da relevância da contaminação de superfícies do ambiente hospitalar na transmissão de patógenos multirresistentes, principalmente *Acinetobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (MRSA), *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina (VRE) e *Clostridium difficile* (Mattner *et al.*, 2012; Weber, Anderson e Rutala, 2013).

Apesar de a transmissão de patógenos de um paciente colonizado ou infectado para um paciente susceptível dar-se geralmente através das mãos dos profissionais da assistência em Saúde (PAS), equipamentos médicos, superfícies e mais raramente o ar contaminados podem estar direta ou indiretamente envolvidos nas vias de transmissão (Weber *et al.*, 2010; Morgan *et al.*, 2012; Weber, Anderson e Rutala, 2013).

Patógenos hospitalares como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Clostridium difficile*, MRSA e VRE podem sobreviver em superfícies inanimadas secas por dias ou até semanas. Diversos estudos demonstraram que as superfícies nos quartos de pacientes colonizados ou infectados por importantes patógenos associados à assistência à saúde frequentemente estão colonizadas (Mattner *et al.*, 2012; Weber, Anderson e Rutala, 2013).

O contato frequente dos PAS com as superfícies e equipamentos dos leitos dos pacientes oferece diversas oportunidades de contaminação das mãos e luvas (Morgan *et al.*, 2012; Weber, Anderson e Rutala, 2013). Um estudo demonstrou que a contaminação das mãos dos PAS com MRSA ocorria em igual frequência se o PAS tivesse contato direto com o paciente colonizado ou infectado ou apenas com superfícies contaminadas (Stiefel *et al.*, 2011 *apud* Weber, Anderson e Rutala, 2013). Morgan e colaboradores (2012) demonstraram que o fator de risco mais importante para a contaminação das mãos/ luvas dos PAS por micro-organismos MDR foi a existência de cultura positiva do ambiente. Outros fatores de risco assinalados foram permanência no leito por um tempo maior que 5 minutos, realização de exame físico e contato com o respirador.

A contaminação do ar no interior de hospitais está associada a construções inadequadas, sistemas de ar condicionado, taxa de ventilação e número de pessoas no ambiente. A concentração de micro-organismos no ar está fortemente relacionada à atividade humana: a circulação de pessoas em salas cirúrgicas, por exemplo, aumenta o número de micro-organismos no ambiente. Não existe um consenso internacional acerca da metodologia e frequência das coletas de ar, nem dos limites de segurança para presença de bactérias no ar. Para salas cirúrgicas, valores como 10 UFC/m<sup>3</sup> e 180 UFC/m<sup>3</sup> já foram propostos (Tang e Wan, 2013).

As águas residuais despejadas diariamente pelos hospitais nas coleções hídricas podem ser um vetor para a disseminação de micro-organismos MDR entre populações humanas e animais, e também de genes de resistência entre as bactérias ambientais, como demonstrado por Ferreira e colaboradores (2011). O estudo identificou a presença de cepas de *A. baumannii* produtoras da enzima OXA-23 isoladas a partir de amostras de águas residuais não tratadas de três hospitais do Rio Grande do Sul.

Por outro lado, bactérias ambientais não patogênicas também podem servir como reservatórios de genes de resistência, que podem causar infecções comunitárias graves, destacando a importância da pesquisa de espécies ambientais (Girlich *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011). Em 2010, um grupo de pesquisadores descreveu uma cepa produtora de OXA-23, isolada a partir de uma amostra coletada de um ponto do Rio Sena distante da desembocadura de águas residuais de hospitais, que apresentava uma relação clonal com outra amostra de origem humana (Girlich *et al.*, 2010).

### 3 LIMPEZA E DESINFECÇÃO

A ANVISA estabelece no manual *Segurança do Paciente em Serviços de Saúde: Limpeza e Desinfecção de Superfícies* (2010), basicamente, dois tipos de limpeza nos ambientes hospitalares. A limpeza concorrente é o procedimento diário em todas as unidades dos estabelecimentos de saúde. Estão incluídas a limpeza de todas as superfícies horizontais, de mobiliários e equipamentos, portas e maçanetas, parapeitos de janelas, e a limpeza do piso e instalações sanitárias, além do recolhimento dos resíduos de acordo com a sua classificação e reposição dos materiais de consumo. A limpeza concorrente deve ser realizada a cada troca de plantão ou duas vezes ao dia.

A limpeza terminal, por sua vez, é aquela realizada após desocupação do leito (transferência, alta hospitalar ou óbito) ou nas internações de longa duração (limpeza terminal programada). É uma limpeza mais completa, incluindo a limpeza de paredes, pisos, teto, painel de gases, equipamentos, todos os mobiliários como camas, colchões, macas, mesas de cabeceira, mesas de refeição, armários, bancadas, janelas, vidros, portas, peitoris, luminárias, filtros e grades de ar-condicionado. Ao final da limpeza terminal, um *checklist* precisa ser preenchido (ANVISA, 2010).

De maneira geral, a limpeza das superfícies do ambiente (chão, paredes, cortinas, etc.) é de responsabilidade da equipe de limpeza da instituição, enquanto os equipamentos e utensílios médicos ficam ao encargo dos profissionais da enfermagem (Weber, Anderson e Rutala, 2013).

Estudos demonstraram que as superfícies no ambiente hospitalar não são adequadamente higienizadas durante a limpeza terminal (Weber *et al.*, 2010; Manian, Griesnauer e Senkel, 2013; Weber, Anderson e Rutala, 2013). Apesar da variação na maneira de avaliar a adequação da limpeza, muitas pesquisas mostraram que menos de 50% das superfícies dos leitos estavam limpas. Deficiências similares também foram demonstradas na limpeza de equipamentos médicos portáteis entre pacientes (Manian, Griesnauer e Senkel, 2013; Weber, Anderson e Rutala, 2013).



Devido às falhas na limpeza terminal, a hospitalização em um leito previamente ocupado por um paciente colonizado ou infectado por patógenos MDR é um importante fator de risco na aquisição desse mesmo patógeno (Weber, Anderson e Rutala, 2013).

A medida básica para prevenção da transmissão de patógenos MDR através das superfícies contaminadas é a implementação de uma limpeza mais eficiente, com uso rigoroso de *checklists* para as diversas superfícies, uso de material adequado e conscientização dos profissionais responsáveis pela limpeza. Além disso, é necessária a adesão de todos os PAS aos protocolos de higienização das mãos. Até o momento, as pesquisas sobre o impacto da melhoria da limpeza e desinfecção de superfícies têm focado apenas na limpeza terminal, mas a limpeza concorrente também representa um papel importante na transmissão de patógenos MDR (Weber *et al.*, 2010; Weber, Anderson e Rutala, 2013).

Segundo o documento de segurança do paciente elaborado pela Anvisa (2010), a limpeza deve ser realizada com sabões e detergentes para as superfícies em geral, restringindo o uso de desinfetantes para situações em que haja presença de matéria orgânica. Os desinfetantes são classificados, de maneira geral, em seis categorias: alcoóis, compostos fenólicos, compostos liberadores de cloro ativo (incluindo o hipoclorito de sódio), compostos quaternários de amônio, monopersulfato de potássio (Virkon®) e oxidantes (ácido peracético). Apesar da legislação vigente no país, muitos hospitais ainda utilizam produtos, técnicas e diluições inadequadas, em desacordo com as recomendações da RDC nº35 (ANVISA, 2010).

Atualmente, existem no mercado tecnologias para prevenir a contaminação das superfícies no ambiente hospitalar: métodos de limpeza “sem toque” e superfícies “auto-desinfetantes”. Os principais métodos de limpeza “sem toque” são aparelhos que geram luz ultravioleta (UV) ou peróxido de hidrogênio. A tecnologia das superfícies “auto-desinfetantes” foi desenvolvida para reduzir a carga bacteriana das superfícies ambientais. Essa característica é obtida impregnando-se ou revestindo-se superfícies com metais pesados, como cobre ou prata, que possuem sabidamente atividade antibacteriana, germicidas (triclosan) ou métodos mistos (antimicrobianos ativados pela luz). A atividade bactericida de superfícies revestidas com cobre, por exemplo, não é afetada pelo uso de desinfetantes e não se perde ao longo do tempo, embora estudos de períodos maiores ainda sejam necessários para

confirmar essa propriedade (Grass, Rensing e Solioz, 2011). Entretanto, esses métodos não substituem a limpeza padrão, uma vez que as superfícies precisam de limpeza física para eliminar sujeiras e detritos (Weber, Anderson e Rutala, 2013).

Uma dificuldade considerável para a garantia da eficiência da limpeza terminal em hospitais brasileiros é a terceirização dos serviços de limpeza do ambiente, prática ainda comum tanto em hospitais públicos quanto privados. O serviço terceirizado está relacionado a uma maior rotatividade dos profissionais nas diversas funções e unidades de um hospital, dessa maneira, a fixação da técnica e das particularidades de cada unidade ficam prejudicadas. Segundo a NR 32 (BRASIL, 2005), a responsabilidade pela capacitação dos profissionais de limpeza terceirizados é tanto da empresa prestadora do serviço quanto do contratante, ambas podendo ser alvos de fiscalização.

#### 4 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO AMBIENTE HOSPITALAR

A busca ativa de pacientes colonizados divide opiniões em diversos países, entretanto a cultura de vigilância para pacientes colonizados por micro-organismos MDR deve ser considerada para o controle de infecções hospitalares (Miriagou *et al.*, 2010). Estudos realizados em situações endêmicas não mostram redução na disseminação de BGN-MDR como um resultado direto da busca ativa. Os protocolos de busca ativa variam entre países e regiões: uns não recomendam a busca, alguns recomendam-na apenas em pacientes selecionados (e seus contatos) e outros, para pacientes, micro-organismos e mecanismos de resistência específicos. Um protocolo bastante aplicado recomenda a vigilância epidemiológica na admissão de novos pacientes oriundos de outra instituição ou de outra unidade da mesma instituição (Mattner *et al.*, 2012; Nordmann e Poirel, 2012).

No Brasil, a ANVISA recomenda nas Notas Técnicas nº1 de 2010 e nº1 de 2013 apenas a cultura de vigilância para pesquisa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC), quando a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) da instituição considerar epidemiologicamente indicada. Não há recomendação específica para os demais BGN-MDR.

Também há bastante discussão em torno do sítio de coleta e método mais representativo para cada tipo de infecção. De forma geral, são coletados *swabs* perianal ou retal em busca de evidência de colonização intestinal, e *swabs* nasais para colonização por MRSA (Miriagou *et al.*, 2010; Mattner *et al.*, 2012). Porém, para algumas espécies, como *A. baumannii*, não existe consenso sobre qual o sítio de coleta é mais adequado, nem sobre a metodologia que apresenta melhor desempenho. Uma vez identificada a colonização por micro-organismos MDR, os protocolos de descolonização ainda não são bem estabelecidos para todas as situações (Mattner *et al.*, 2012).

A cultura de vigilância do ambiente hospitalar também pode ser implementada para a detecção de reservatórios de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos (AbRC) e outros BGN-MDR (Paterson, 2006; Tsakris *et al.*, 2008). Em geral, quando ocorre um surto em um hospital, uma fonte ambiental relacionada pode ser identificada através de uma busca metódica. Uma vez descoberto esse reservatório,

medidas específicas de controle de infecção podem ser instituídas, mas até lá, outras medidas podem refrear o processo de disseminação (La Forgia *et al.*, 2010).

Embora não existam protocolos padronizados para a cultura de vigilância do ambiente, alguns estudos demonstram que técnicas quantitativas, envolvendo o uso de meios para enriquecimento ou soluções neutralizadoras para diminuir a atividade residual de desinfetantes, são mais sensíveis na identificação de contaminação em superfícies (Manian, Griesnauer e Senkel, 2013).

A pesquisa da contaminação de superfícies com a utilização de *swabs* estéreis umedecidos é mais prática e barata, no entanto, pode subestimar o real número de focos, devido à possível ineficiência na detecção de níveis mais baixos de contaminação (Tsakris *et al.*, 2008; Manian, Griesnauer e Senkel, 2013).

A seleção dos meios utilizados para o cultivo das amostras, como ocorre para a cultura de vigilância em pacientes, depende do objetivo da pesquisa. Em geral estes incluem um meio rico em nutrientes, normalmente ágar sangue de carneiro, e um meio mais seletivo para o grupo de micro-organismos que se busca, como meios específicos para micro-organismos Gram-negativos ou Gram-positivos (Dalben *et al.*, 2009; Manian, Griesnauer e Senkel, 2013). Além disso, pode-se adicionar antimicrobianos em concentrações determinadas para selecionar apenas os micro-organismos resistentes (Marchaim *et al.*, 2007).

## 5 ENTEROBACTÉRIAS

A família *Enterobacteriaceae* é composta por diversos gêneros que possuem uma ampla distribuição na natureza: água, solo, plantas e microbiota intestinal de animais e do homem (Fariñas e Martínez-Martínez, 2013). No ambiente hospitalar, as enterobactérias são importantes patógenos oportunistas (Livermore e Woodford, 2006) e seu principal mecanismo de transmissão é através das mãos dos profissionais de saúde, que se colonizam quando entram em contato com outros pacientes colonizados ou infectados (Fariñas e Martínez-Martínez, 2013).

Muitas enterobactérias possuem  $\beta$ -lactamase cromossômica (classe A ou C) e expressam bombas de efluxo de forma basal ou aumentada - o que determina uma resistência intrínseca a diversos antimicrobianos. Elas também adquirem facilmente plasmídeos que codificam outras  $\beta$ -lactamases e mecanismos de resistência a outros grupos de antimicrobianos, como aminoglicosídeos e quinolonas (Livermore e Woodford, 2006; Fariñas e Martínez-Martínez, 2013; Perez e van Duin, 2013).

A multirresistência em enterobactérias está frequentemente associada à presença de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), AmpC plasmidial e de carbapenemases (KPC, NDM, IMP, VIM, OXA-48). Embora mais frequentes no ambiente hospitalar, esses mecanismos de resistência têm sido descritos na comunidade, em especial a produção de ESBL (Nordmann e Poirel, 2012; Fariñas e Martínez-Martínez, 2013).

A produção de carbapenemases está alcançando dimensões extremamente preocupantes em diversos países, inclusive no Brasil (Fariñas e Martínez-Martínez, 2013; Perez e van Duin, 2013). Infecções invasivas por ERC estão associadas a piores desfechos clínicos quando comparadas a infecções por enterobactérias sensíveis aos carbapenêmicos. Da mesma forma, o aumento da concentração inibitória mínima (CIM) para os carbapenêmicos também está associada a um aumento no risco de morte (van Duin *et al.*, 2013).

Existe mundialmente a necessidade de controlar a disseminação de ERC através do uso racional de antimicrobianos e da implementação de medidas de controle de infecção (van Duin *et al.*, 2013).

## 6 *PSEUDOMONAS* spp.

O gênero *Pseudomonas* tem uma ampla distribuição em diversos ambientes, com preferência pelos ambientes úmidos (Paterson, 2006; Fariñas e Martínez-Martínez, 2013). Entre as diversas espécies do gênero, *Pseudomonas aeruginosa* é a que apresenta maior relevância clínica, uma vez que causa infecções graves, com elevada morbimortalidade em pacientes imunossuprimidos, especialmente em unidades de tratamento intensivo e oncohematológicas (Fariñas e Martínez-Martínez, 2013).

*P. aeruginosa* raramente faz parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis. Quando ocorre colonização nesses indivíduos, os sítios observados são o trato gastrointestinal e partes úmidas do corpo, como a orofaringe, a mucosa nasal, axilas e períneo. A contaminação de piscinas, soluções para lentes de contato e até tênis já foi descrita, mas as infecções associadas raramente são devidas a cepas MDR (Paterson, 2006).

Substâncias aquosas utilizadas no atendimento em saúde, como desinfetantes, sabonetes, fluidos para irrigação, colírios e fluidos para diálise, podem ser contaminadas por *P. aeruginosa*. Essa espécie também é frequentemente encontrada em ventiladores, nos ralos das pias e no material de terapia respiratória (Paterson, 2006).

As IAS mais frequentemente causadas por esse micro-organismo incluem pneumonias, bacteremias, infecções de feridas cirúrgicas e do trato urinário. Também é um importante patógeno em pacientes portadores de fibrose cística, sendo o micro-organismo mais frequente nas infecções respiratórias crônicas (Fariñas e Martínez-Martínez, 2013).

Devido à baixa permeabilidade de sua membrana externa, a *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente à maioria das penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração (exceto ceftazidima), tetraciclinas e rifampicina. Essa resistência basal também pode ser devida à presença de bombas de efluxo e produção de uma  $\beta$ -lactamase do tipo AmpC cromossomal. Além disso, algumas cepas produzem enzimas de outras  $\beta$ -lactamases adquiridas, como algumas

enzimas tipo OXA, ESBL e carbapenemases (Livermore e Woodford, 2006; Zavascki *et al.*, 2010; Fariñas e Martínez-Martínez, 2013).

A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* pode ser devida à deficiência da porina OprD, responsável pela entrada desses antibióticos na célula, à hiperexpressão da AmpC cromossomal e/ou de bombas de efluxo e à produção de carbapenemases (Fariñas e Martínez-Martínez, 2013). As carbapenemases mais frequentes nessa espécie são as metalo- $\beta$ -lactamases (MBL) dos tipos IMP, VIM e SPM, no entanto, a enzima NDM e a carbapenemase de classe A, KPC, também já foram descritas (Villegas *et al.*, 2007; Fariñas e Martínez-Martínez, 2013).

A ocorrência de infecções por *P. aeruginosa* MDR tem sido associada a uma maior frequência de bacteremia secundária e morte (Fariñas e Martínez-Martínez, 2013). Um estudo realizado por Cezário e colaboradores (2009) em um hospital universitário de Minas Gerais analisou 47 casos de infecção por *P. aeruginosa* resistente a imipenem em pacientes internados em uma unidade intensiva. Os autores identificaram que, em 95% dos casos, o micro-organismo apresentou padrão de resistência extrema, sendo sensíveis apenas a polimixina. Ao comparar esse grupo a 122 pacientes controle (sem infecção por *P. aeruginosa* resistente a imipenem), observou-se que a idade avançada, o uso de ventilação mecânica, traqueostomia e uso prévio de carbapenêmicos eram fatores de risco para uma infecção por *P. aeruginosa* MDR.

Outro estudo de caso controle conduzido em dois hospitais dos Estados Unidos observou que o isolamento de uma cepa de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos foi um fator de risco independentemente associado a uma elevada mortalidade para os pacientes internados, mas essa relação só foi significativa para as amostras recuperadas de hemoculturas. Além disso, a infecção ou colonização por uma *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos também estava associada a um aumento dos custos hospitalares e do tempo de internação, em relação à infecção ou colonização por *P. aeruginosa* sensível a esses antimicrobianos (Lautenbach *et al.*, 2010).

## 7 *ACINETOBACTER* spp.

O gênero *Acinetobacter* é mais frequentemente encontrado na natureza, mas também tem se destacado no ambiente hospitalar nas últimas décadas devido à frequência e gravidade das infecções causadas pelo Complexo *Acinetobacter baumannii* (CAb), formado pelas espécies *A. baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis* e *Acinetobacter pittii*. A espécie *A. baumannii* emergiu como a mais frequente em IrAS, em parte devido à sua capacidade de persistir em unidades hospitalares, em especial nos centros de terapia intensiva (CTIs) (Peleg, Seifert e Paterson, 2008).

A dificuldade da distinção fenotípica dos membros desse gênero, no entanto, tem deixado uma lacuna no conhecimento das suas verdadeiras características epidemiológicas (Marti *et al.*, 2008; Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Livermore, 2009; Roca *et al.*, 2012). A diferenciação das espécies desse gênero pode ser obtida através de sequenciamento de genes conservados, principalmente o *rpoB* (Gundi *et al.*, 2009). Recentemente uma nova metodologia, a espectrometria de massa com analisador de tempo de voo e ionização a laser assistida por matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry- MALDI-TOF MS*), tem se mostrado promissora na identificação de espécies do CAb, entretanto os bancos de dados ainda precisam ser adaptados para identificação de outras espécies do gênero (Espinal *et al.*, 2012).

De maneira geral, considera-se que *A. baumannii* é um patógeno de baixa virulência, exceto para pacientes críticos ou imunocomprometidos (Fariñas e Martínez-Martínez, 2013), embora estudos mais recentes contestem essa afirmação. Cepas do CAb, em especial da espécie *A. baumannii*, apresentam importantes fatores de virulência como formação de biofilme, aderência a células do epitélio pulmonar e resistência ao ressecamento (Gianoulli *et al.*, 2013).

Os principais fatores de risco para a aquisição de infecção por esse micro-organismo são: tempo de hospitalização, gravidade da doença de base, ventilação mecânica prolongada, antibioticoterapia prévia, internação prolongada no CTI, procedimentos invasivos e colonização prévia por *Acinetobacter* (Maragakis e Perl, 2008; Towner, 2009; Fariñas e Martínez-Martínez, 2013).

*A. baumannii* é um patógeno oportunista que pode sobreviver por longos períodos (até três meses) tanto nas superfícies úmidas quanto nas secas,



capacidade reforçada pela formação de biofilme, o que dificulta a prevenção de sua disseminação no ambiente hospitalar (Paterson, 2006; Roca *et al.*, 2012; Gianoulli *et al.*, 2013). Esse patógeno tem sido isolado da pele dos profissionais de saúde, de estetoscópios, umidificadores, equipamentos de ventilação mecânica, cateteres de sucção e outros equipamentos de assistência médica, contêineres de água destilada, colchões, travesseiros, cortinas, maçanetas e teclados de computadores (Villegas e Hartstein, 2003; Saalfeld *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2010; Fariñas e Martínez-Martínez, 2013).

A contaminação das mãos e luvas dos profissionais, de superfícies do leito e de equipamentos médicos é muito importante na disseminação de *A. baumannii* durante os surtos. Além disso, as transmissões paciente a paciente e aérea também já foram comprovadas (Maragakis e Perl, 2008; Towner, 2009; Weber *et al.*, 2010; Morgan *et al.* 2012). Em um estudo realizado em 2010, Weber e colaboradores observaram que a frequência da contaminação ambiental por *Acinetobacter* spp. em unidades nas quais houve surto por este micro-organismo variou entre 3 e 50%.

Atualmente, o número de cepas de *Acinetobacter* spp. MDR aumentou significativamente, muito provavelmente em consequência do uso extensivo de antimicrobianos de potente espectro de ação (Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Towner, 2009). Cepas clínicas de AbRC têm surgido em todo o mundo, sendo a produção de carbapenemases do tipo OXA o principal mecanismo de resistência a essas drogas. Em alguns casos, o único antimicrobiano com atividade contra esses micro-organismos é a polimixina. Nos últimos anos, no entanto, já foram relatadas cepas resistentes a essa droga, sendo definidas como pan-resistentes (Poirel e Nordmann, 2006a; Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Livermore, 2009; Towner, 2009; Zarrilli *et al.*, 2009).

No Brasil, diversos casos de AbRC já foram descritos nas regiões sul e sudeste: no Paraná, em São Paulo, no Rio de Janeiro, em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul. A carbapenemase predominantemente encontrada é a OXA-23 (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009; Schimith Bier *et al.*, 2010), mas já houve descrição de OXA-72 em São Paulo (Werneck *et al.*, 2010) e em Recife (de Sá Cavalcanti *et al.*, 2013), de OXA-143 em estados do sul e do sudeste (Higgins *et al.*, 2009; Antonio *et al.*, 2011), e de OXA-58 em São Paulo (Antonio *et al.*, 2011), no Rio de Janeiro (Figueiredo *et al.*, 2011) e no Rio Grande do Sul (Gusatti *et al.*, 2012).

Nosso grupo descreveu a presença da carbapenemase OXA-23 em amostras de *A. baumannii*, em *A. pittii* e em duas outras amostras *não-baumannii* em pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE/UERJ) (Silva, 2010; Barbosa, 2011; Lobo, 2012). Entretanto, as amostras de Anb portadoras do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foram sensíveis aos carbapenêmicos, alertando para a possível disseminação silenciosa de genes de resistência entre espécies de *Acinetobacter*, em que as espécies ambientais estariam servindo como reservatórios (Silva, 2010).

Na cidade do Rio de Janeiro existiam dois clones prevalentes circulando entre diversos hospitais públicos e privados até o ano de 2009 (Carvalho *et al.*, 2009), ambos detectados também no HUPE/UERJ em um surto ocorrido entre 2007 e 2008, e durante o ano de 2009 (Silva, 2010; Barbosa, 2011). Pôde-se observar uma grande diversidade genética entre as amostras de *A. baumannii* no hospital em questão, especialmente na unidade de tratamento intensivo, onde os casos de infecção por esse micro-organismo são mais frequentes. Observou-se também para o HUPE uma flutuação de genótipos representada pela substituição do clone prevalente na instituição entre 2007 e 2008 por outro com grande potencial epidêmico, predominante no Rio de Janeiro, no CTI Geral durante o ano de 2009 (Silva, 2010; Barbosa, 2011).

Uma vez endêmico em uma unidade de saúde, *A. baumannii* é bastante difícil de ser erradicado. Medidas normais de controle de infecção se mostram frequentemente insuficientes para deter a disseminação de *A. baumannii* MDR (Towner, 2009). É bastante provável que a disseminação do clone predominante no Rio de Janeiro tenha ocorrido pela transferência de pacientes colonizados ou infectados entre as instituições e/ou por profissionais de saúde que trabalhem em mais de um centro médico. Além disso, é possível que as medidas de controle de infecção adotadas para contenção do surto 2007-2008 não tenham conseguido conter a disseminação de *A. baumannii* na instituição (Barbosa, 2011).

Devido às características epidemiológicas deste grupo de micro-organismos, a higienização e as medidas de controle de infecções como a lavagem das mãos, precauções de contato e limpeza e desinfecção adequada do ambiente devem ser re-enfatizadas e aprimoradas, e a política do uso de antimicrobianos, revista (Maragakis e Perl, 2008; Towner, 2009).

O conhecimento sobre a ecologia e epidemiologia das outras espécies de *Acinetobacter* é limitado, em muito devido à dificuldade para a caracterização em nível de espécie apresentada pelos métodos usados na rotina laboratorial. Assim, a pesquisa de espécies não-*baumannii* que possam estar servindo como reservatório de determinantes de resistência se faz relevante (Choi *et al.*, 2012), na medida em que gera um conhecimento epidemiológico bastante útil no combate às infecções por *Acinetobacter* spp. MDR.

## 8 RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS

Micro-organismos ambientais estão expostos a um número maior de variações e condições adversas em seu habitat, e são mais sensíveis às mudanças do que espécies de plantas e animais. A poluição de coleções hídricas e solos pela atividade industrial, esgotos sanitários e fertilizantes utilizados para a agricultura representa um dos principais desafios para as comunidades microbianas (Zhao *et al.*, 2014). De maneira geral, a resistência natural aos compostos tóxicos a que esses micro-organismos são expostos, incluindo metais pesados, resulta de uma alta adaptabilidade dos sistemas celulares às mudanças ambientais (Aradská *et al.*, 2013).

Genes de resistência a metais pesados frequentemente são encontrados juntos a genes de resistência a antimicrobianos em plasmídeos, muitos deles associados a surtos hospitalares. A exposição a qualquer composto (ou combinações entre eles) aos quais esses genes conferem resistência é capaz de favorecer a manutenção do plasmídeo, portanto ambientes contaminados com metais também podem selecionar resistência a antimicrobianos (Gullberg *et al.*, 2014).

Diversos estudos têm descrito a tolerância a metais em bactérias isoladas de diversos ambientes, entretanto a ausência de uma técnica padronizada para a determinação desse fenótipo dificulta a comparação entre os dados gerados. A sensibilidade a metais tem sido estudada para compostos frequentemente encontrados no ambiente, como arsênico, níquel, cromo, cádmio, cobre, telurito, mercúrio e zinco (Taylor *et al.*, 2002; Akinbowale *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2012).

O arsênico é um elemento químico que ocorre naturalmente no ambiente, porém atividades humanas como a mineração aumentam os níveis de contaminação ambiental por esse metal. Suas formas pentavalente e trivalente, arsenato As(V) e arsenito As(III), respectivamente, perturbam o funcionamento normal das células. A contaminação da água por arsênico representa um problema de saúde pública e é considerada uma das principais causas ambientais de câncer de pele, pulmões, bexiga e rins (Costa *et al.*, 2014; Isokpehi *et al.*, 2014). A ampla distribuição do arsênico na natureza significa que células de todos os organismos, procariotos e

eucariotos, devem desenvolver mecanismos para responder ao estresse induzido pela exposição ao arsênico. As bactérias desenvolveram diversas estratégias para transformar arsênico, incluindo a oxidação do arsenito, redução citoplasmática do arsenato, redução do arsenato via respiração e metilação do arsenito (Cai, Liu, *et al.*, 2009; Isokpehi *et al.*, 2014).

Em geral, a contaminação do solo com altos níveis de arsênico exerce uma forte pressão seletiva, levando a uma baixa diversidade microbiana. A presença de As(V) e As(III) não inibe a respiração ou diminui a biomassa microbiana no solo, mas estimula a proliferação de certos grupos de micro-organismos - resultando em uma mudança na comunidade microbiana bastante significativa quando comparado com outros compostos como o cromo e cobre (Turpeinen, Kairesalo e Häggblom, 2004; Cai, Liu, *et al.*, 2009).

Os genes de resistência a arsênico melhor caracterizados incluem: a) o repressor de transcrição responsivo a As(III) *arsR*, que se liga à região promotora e regula o operon *ars*; b) a ATPase transportadora de ânions *arsA*; c) uma proteína de transporte localizada na membrana, *arsB*, que pode expulsar o As(III) da célula utilizando força próton-motora; d) uma redutase de As(V) citoplasmática, *arsC*; e) o repressor do operon de resistência a arsênico *arsD*, que regula o operon como um repressor fraco e secundário; f) uma arilsulfatase, *arsH*; g) As(III) metiltransferase, *arsM*. Um operon *ars* típico deve conter de três a cinco genes e normalmente estão organizados como *arsRBC*, *arsRABC* e *arsRDABC*, mas os genes também podem estar presentes individualmente no genoma (Cai, Rensing, *et al.*, 2009; Isokpehi *et al.*, 2014).

Dois famílias de proteínas responsáveis pela extrusão de As(III), são capazes de conferir resistência a arsênico: *ArsB* e *Acr3p*. Geralmente o As(III) entra na célula através de porinas e é expulso pela *ArsB* (Cai, Liu, *et al.*, 2009). Membros da família de proteínas transportadoras *Acr3p* apresentam uma função semelhante à de *ArsB*, porém as duas proteínas não possuem uma similaridade significativa. Contudo, embora *Acr3p* esteja menos caracterizada, ela já foi descrita em espécies mais distantes filogeneticamente e alguns estudos sugerem, que essa proteína seja predominante em relação a *ArsB*.

Os genes de proteínas transportadoras de arsenito, *arsB*, *ACR3(1)* e *ACR3(2)*, já foram detectados em cepas de diversas espécies, isoladas a partir de solos com níveis intermediário e alto de contaminação por arsênico e podem

coexistir em um mesmo micro-organismo (Cai, Liu, *et al.*, 2009). Além disso, esses genes podem ser transferidos horizontalmente, aumentando sua prevalência em populações microbianas sob condições de estresse por exposição prolongada a arsênico (Cai, Rensing, *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2014).

Já o ânion de telúrio, raramente encontrado no ambiente, é geralmente originado a partir de atividades industriais e extremamente tóxico tanto para bactérias quanto para a saúde humana (Anantharaman, Iyer e Aravind, 2012). A toxicidade do telurito é resultado da sua atuação como um agente oxidante forte, levando à ativação de uma série de rotas metabólicas para tentar minimizar os efeitos da exposição (Aradská *et al.*, 2013). Diversos *loci* envolvidos na respiração, na fotossíntese e na fixação de CO<sub>2</sub> são importantes para uma resistência elevada a telurito, indicando que esse é um fenômeno complexo e que envolve múltiplos mecanismos, alguns dos quais são universais nas bactérias (O'Gara, Gomelsky e Kaplan, 1997). Cepas sensíveis de *E. coli* são capazes de desencadear uma expressão coordenada de proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo ao serem expostas ao telurito (Aradská *et al.*, 2013).

Os determinantes de resistência a telurito identificados em Gram-negativos, especificamente em enterobactérias, foram inicialmente detectados em plasmídeos: o *operon ter* (*terZABCDEF*) e o *operon Kila* (*kilA*, *telA*, *telB*) (O'Gara, Gomelsky e Kaplan, 1997; Anantharaman, Iyer e Aravind, 2012). Já o *operon teh* (*tehAB*) é cromossomal, com origem em *E. coli* (Taylor *et al.*, 1994). Outras famílias de proteínas e homólogos das proteínas mencionadas já foram descritos em espécies como *Rhodobacter sphaeroides* (O'Gara, Gomelsky e Kaplan, 1997), *Pseudomonas syringae* e no gênero *Alcaligenes* (Anantharaman, Iyer e Aravind, 2012).

Existem evidências de diversificação funcional dos diversos genes do *operon ter*, o que sugere que a resistência a telurito requer especificamente *terB*, *terC*, *terD* e *terE*. Apesar dos diversos estudos que apontam a importância do *operon ter* e do gene *telA* na resposta ao estresse em linhagens bacterianas muito distantes, a bioquímica e o modo de ação dessas proteínas permanece bastante desconhecido (Anantharaman, Iyer e Aravind, 2012).

Os genes que codificam a família TerY de proteínas fazem parte de um módulo composto por mais dois genes, que codificam uma fosfatase da superfamília PP2C e uma serina/treonina/tirosina quinase. Juntas, essas proteínas formam a tríade TerY-fosforilação (TerY-P). Esse módulo de genes pode ocorrer associado a

um *operon* ter ou independentemente, em outras regiões do genoma (Anantharaman, Iyer e Aravind, 2012).

O mecanismo proposto para a resistência a telurito mediada pelo *operon* plasmidial *kilA* é a facilitação da redução do telurito, não um aumento do efluxo ou diminuição na entrada do composto. O produto do gene *klaB* (*teIA*) também pode codificar propriedades adicionais de resistência, porém acredita-se que a principal função desse *operon* está ligada à manutenção do plasmídeo (O'Gara, Gomelsky e Kaplan, 1997).

## 9 SEQUENCIAMENTO DE GENOMAS

A crescente facilidade na aplicação de ferramentas de sequenciamento de genomas completos tem levado diversos pesquisadores a considerar a identificação de bactérias através do seu genoma, aliado a uma descrição mínima de suas características fenotípicas, superando o modelo polifásico tradicionalmente aceito (Chan *et al.*, 2012; Diene *et al.*, 2013; Vandamme e Peeters, 2014). Outros autores defendem que a análise de genomas complementa o método polifásico, ao invés de substituí-lo (Ramasamy *et al.*, 2014). Uma das principais vantagens da substituição do método polifásico, baseado em características fenotípicas, genotípicas e quimiotaxonômicas, é a possibilidade de identificar micro-organismos não cultiváveis, além de ser mais facilmente reproduzível em diferentes laboratórios (Chan *et al.*, 2012; Vandamme e Peeters, 2014).

A técnica de comparação de identidade média de nucleotídeos (*Average nucleotide identity- ANI*), baseada em todas as sequências compartilhadas por dois genomas, apresenta uma forte correlação com os resultados da hibridização DNA-DNA (DDH), atual padrão ouro da taxonomia bacteriana (Goris *et al.*, 2007; Vandamme e Peeters, 2014), e é considerada a melhor candidata para substituição da DDH na taxonomia de procariotos (Richter e Rosselló-Móra, 2009). Uma das principais vantagens da ANI em relação a outras técnicas de análise de genomas é que ela permite o uso de genomas incompletos (*drafts*) (Richter e Rosselló-Móra, 2009).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism- SNPs*) são considerados adequados para a construção de árvores filogenéticas por apresentar baixa taxa de mutação e serem evolutivamente estáveis (Leekitcharoenphon *et al.*, 2012). A informação gerada por essa técnica é robusta e confiável para classificação de cepas e para análises de relações filogenéticas, com resultados mais fortes que aqueles gerados pela tipificação das sequências de múltiplos loci (*Multilocus sequence typing- MLST*) (Stucki e Gagneux, 2013; Castro-Nallar *et al.*, 2015).

Além da clara contribuição do sequenciamento de genomas na identificação de micro-organismos, o uso de genomas para extrapolar informações sobre



processos biológicos fundamentais de organismos modelos para outros clinicamente relevantes, porém menos estudados, tem sido demonstrado como uma ferramenta útil para o conhecimento sobre determinados micro-organismos (Robinson *et al.*, 2010).

## 10 JUSTIFICATIVA

Com o aumento da incidência de IrAS graves causadas por BGN-MDR, associadas a altas taxas de morbi-mortalidade, aumento do tempo de hospitalização e custo, o controle de infecções assumiu um papel essencial na saúde pública.

No ano de 2009, nosso grupo avaliou prospectivamente a dinâmica de colonização/infecção de pacientes internados por períodos prolongados no CTI Geral do HUPE. A pesquisa mostrou que a maioria dos pacientes apresentou substituição dos clones de *Acinetobacter* spp. ao longo do período de internação. Para os pacientes com maior tempo de internação, o clone inicialmente observado foi substituído pelo clone prevalente nessa unidade, o mesmo encontrado em diversos hospitais na cidade do Rio de Janeiro, sugerindo a existência de reservatórios ambientais desse genótipo (Barbosa, 2011). Dessa forma, mostrou-se necessária a identificação e erradicação de possíveis fontes ambientais de *Acinetobacter* spp. para que as demais medidas de controle de infecção sejam mais eficientes na Instituição.

A partir dessa observação, a colonização do ambiente hospitalar por BGN tornou-se alvo deste estudo, a fim de contribuir para um maior conhecimento de possíveis fontes ambientais de micro-organismos dentro do cenário hospitalar. Utilizou-se uma abordagem ampla, no sentido de conhecer quais os BGN mais frequentes nesse ambiente, e seu perfil de resistência. Em seguida, metodologias mais robustas, associadas ao sequenciamento de genoma, foram aplicadas para uma cepa de *Acinetobacter* representativa do ambiente, devido à relevância desse gênero na Unidade. Assim, esperamos ajudar a propiciar uma melhor qualidade do serviço de saúde prestado aos pacientes, com novos conhecimentos acerca das vias de transmissão de micro-organismos no CTI, relevantes ao aprimoramento de medidas de controle das infecções.

## 11 OBJETIVOS

### 11.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência, susceptibilidade a antimicrobianos e a presença de genes de resistência em amostras de bacilos Gram-negativos (BGN) isoladas do ambiente de um Centro de Tratamento Intensivo do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CTI-HUPE).

### 11.2 Objetivos específicos

- Coletar amostras de ar e de superfícies;
- Identificar as espécies de BGN por técnicas fenotípicas e moleculares;
- Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das amostras selecionadas;
- Detectar fenotipicamente a produção de carbapenemases em enterobactérias;
- Investigar a presença de genes de ESBL e de carbapenemases dos tipos KPC e OXA nas amostras com fenótipo de multirresistência (MDR);
- Identificar uma amostra de *Acinetobacter* não-*baumannii* através do sequenciamento do gene *rpoB* e pela análise do perfil protéico através de técnica de espectrometria de massa;
- Sequenciar o genoma completo da amostra de *Acinetobacter* não-*baumannii*;
- Analisar o genoma da amostra de *Acinetobacter* não-*baumannii* em relação a:
  - a) relações filogenéticas através da comparação de genomas;
  - b) genes de resistência a antimicrobianos e metais;
  - c) genes de elementos móveis;
  - d) genes relacionados à persistência no ambiente.
- Determinar a concentração inibitória mínima para antimicrobianos e metais na amostra de *Acinetobacter* não-*baumannii*.

## 12 METODOLOGIA

### 12.1 Coleta de amostras ambientais

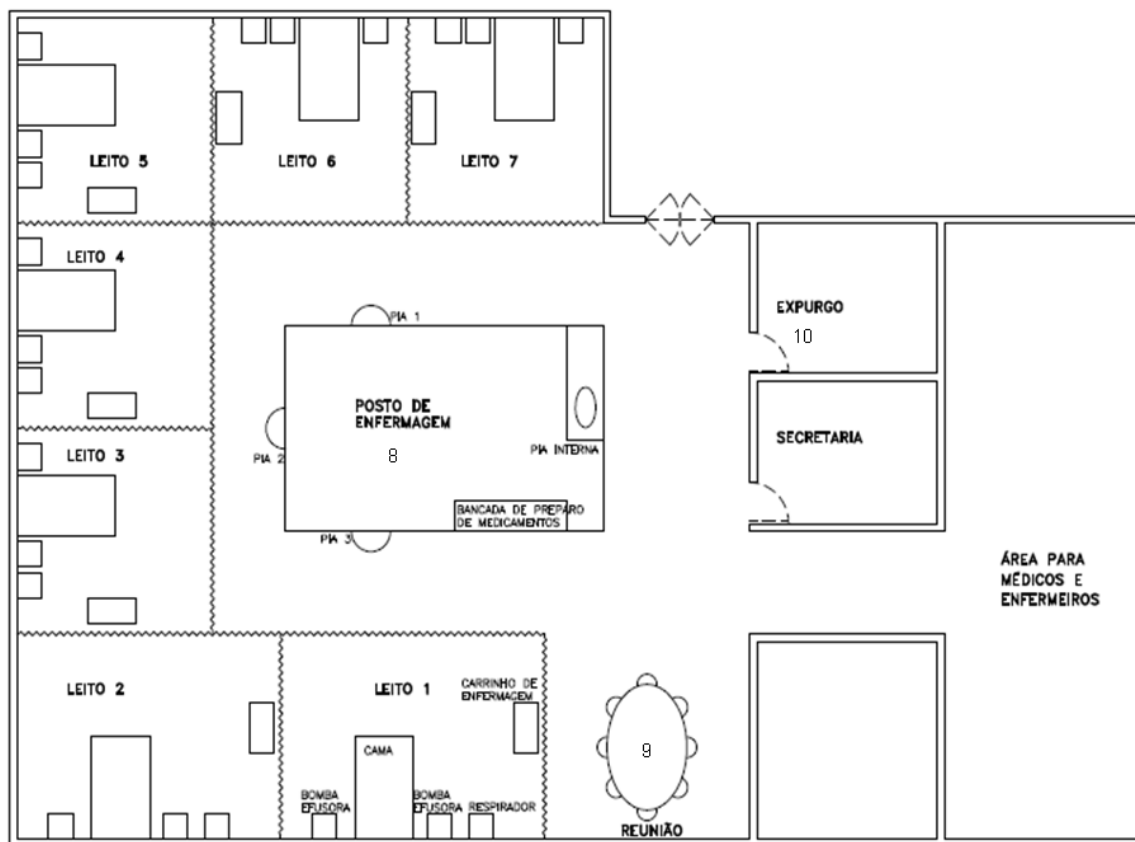
Foram realizadas seis coletas entre os meses de janeiro e julho de 2012, com exceção do mês de fevereiro, no CTI Geral do HUPE, um hospital universitário terciário do Rio de Janeiro. Durante o período de coletas, o CTI Geral estava situado no quarto andar do hospital e possuía sete leitos, que recebiam pacientes provenientes de unidades clínicas e cirúrgicas. Os leitos estavam dispostos ao redor do posto de enfermagem, localizado no centro da unidade, além de uma área utilizada para as reuniões e uma sala de expurgo. Os pontos de coleta foram selecionados de forma a representar os diversos microambientes: o leito, o posto de enfermagem, a área de reuniões e a saída do expurgo. Em março de 2013, o setor foi transferido para uma nova área do hospital, desenhada especificamente para atender às necessidades de um centro de terapia intensiva.

Cada leito era composto essencialmente pela cama, pelo ventilador mecânico (respirador), por bombas infusoras de medicamentos em número variável, um carrinho de metal em que ficavam os materiais utilizados pela enfermagem e uma lixeira individualizada. Os leitos eram separados uns dos outros e da área de circulação por uma cortina de material lavável, própria para ambientes hospitalares.

O posto de enfermagem era cercado por três pias externas, destinadas à lavagem de mãos de funcionários e visitantes. Havia também uma pia interna, utilizada apenas pelos profissionais do setor durante o preparo e manuseio de medicações. Além de armários para armazenamento de medicamentos e materiais de consumo, o posto possuía uma bancada para assuntos administrativos e uma bancada para preparo dos medicamentos.

A área de reuniões era composta por uma mesa de madeira, um sofá e cadeiras. Essa área era separada do leito um por uma cortina. A saída do expurgo foi selecionada por estar diretamente em contato com o ambiente dos pacientes e por permanecer com a porta aberta frequentemente (Figura 1).

Figura 1 - Planta baixa do CTI Geral do HUPE em 2012



Fonte: A Autora, 2015

Considerou-se ponto de coleta os microambientes citados, sendo numerados de um a dez: pontos 1 a 7 correspondentes aos leitos de igual numeração; ponto 8 correspondendo ao posto de enfermagem; ponto 9 à área de reuniões e ponto 10 à saída do expurgo. Para cada ponto de coleta, foram selecionados sítios de coleta considerados representativos do ambiente, relacionados nos itens seguintes (Tabela 1).

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do HUPE (CEP/HUPE) sendo aprovado e registrado sob o número 2975/2011.

Tabela 1 - Distribuição dos pontos e sítios de coleta do ar e das superfícies do CTI Geral do HUPE.

<b>Ponto de coleta</b>	<b>Sítios de coleta</b>
<b>Leitos(1 a 7)</b>	Carrinho de enfermagem Respirador Bomba infusora 1 Bomba infusora 2 Ar- aparelho sobre carrinho de enfermagem
<b>Posto de enfermagem (8)</b>	Bancada de preparo de material Pia 1 Pia 2 Pia 3 Pia interna Ar- aparelho sobre bancada
<b>Sala de reuniões (9)</b>	Mesa de reuniões Ar- aparelho sobre a mesa
<b>Expurgo (10)</b>	Ar- aparelho sobre banco, em frente à porta

Fonte: A Autora, 2015

### 12.1.1 Superfícies

Para representar a colonização das superfícies dos leitos foram selecionados os seguintes sítios: até duas bombas infusoras e respirador (quando em uso) e a superfície do carrinho utilizado pela enfermagem. Para o microambiente do posto de enfermagem, foram coletadas amostras dos ralos de todas as pias e da bancada de preparo de medicamentos. Na área de reuniões, apenas a superfície da mesa foi avaliada.

Para as bombas e o respirador, o material foi coletado dos botões de ajuste dos parâmetros. Para o carrinho de enfermagem, bancada do posto de enfermagem e mesa de reuniões foi coletada uma superfície de aproximadamente 10 cm<sup>2</sup>, em duas direções, sempre girando o *swab*.

As amostras de superfícies inanimadas nas proximidades do leito foram coletadas com o uso de *swabs* pré-umedecidos em solução salina estéril a 0,9% e transportadas em meio *Stuart* para posterior semeadura. Foi semeado um par de placas por sítio de coleta: uma placa de ágar sangue, composto por ágar Columbia (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) suplementado de 5% de sangue de carneiro (EBEFARMA, Niterói, Rio de Janeiro), para garantir o crescimento de micro-organismos nutricionalmente exigentes, e outra de ágar *Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient* (CLED, BBL/BD). O mesmo *swab* foi semeado nas duas placas, primeiramente na placa de ágar sangue, pela técnica de esgotamento. Ambas as placas foram incubadas a 35°C ± 2°C por 24h, em aerobiose, com reincubação por mais 24h, quando necessário.

#### 12.1.2 Ar

Para todos os pontos de coleta, o ar foi considerado um sítio, em que um par de placas foi semeado. As amostras de ar foram coletadas com o aparelho MAS-100 *air sampler* (Merck) (Figura 2) como descrito por Nunes *et al.*, 2005. O aparelho foi ajustado para coletar 250 L de ar por 5 minutos, para cada placa (ágar Sangue e ágar CLED). Nos leitos, o aparelho foi posicionado nos carrinhos de enfermagem, com o cabeçote direcionado para o paciente. Para a bancada do posto de enfermagem e mesa de reuniões, o aparelho foi posicionado aproximadamente no centro da superfície, com cabeçote direcionado para o teto. Para a coleta do ar da saída do expurgo (ponto 10), o aparelho foi colocado em cima de uma superfície distante aproximadamente 1m do chão, com o cabeçote direcionado para a porta.

Figura 2 - Aparelho de coleta de ar MAS-100 *air sampler* (Merck).



Fonte: [http://www.mbv.ch/images/db/mbv\\_20090623\\_162104.jpg](http://www.mbv.ch/images/db/mbv_20090623_162104.jpg)

O aparelho possui um cabeçote dotado de 300 furos com 0,6mm de diâmetro cada, com tamanho compatível para placas de Petri de 90x15mm. A placa é posicionada sem tampa no interior do aparelho e, ao passar pelos furos, o ar é inoculado na placa. Ao fim da coleta, o cabeçote é retirado e coloca-se imediatamente a tampa da placa. As placas foram transportadas para o laboratório em recipiente fechado e opaco.

As placas foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48h em aerobiose. Em seguida, todas as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas e os resultados convertidos segundo instruções do fabricante, através de uma tabela que considera o princípio de que uma vez que o número de partículas viáveis sendo inoculadas na placa aumenta, a probabilidade de a próxima partícula ir para um “espaço vazio” diminui. Os números obtidos são representados em UFC/m<sup>3</sup>.

## 12.2 Intervenção

Na segunda quinzena do mês de março foi instituído, através de documento interno da unidade, um novo protocolo de limpeza no CTI Geral, com a utilização de



um desinfetante de superfícies cujo ingrediente ativo é o monopersulfato de potássio, o Virkon<sup>®</sup>, registrado pela ANVISA. Esse produto é um desinfetante de amplo espectro que possui boa biocompatibilidade com materiais, evitando corrosão e outros danos.

A limpeza passou a ser feita de duas a três vezes ao dia, em movimentos unidirecionais. Foi utilizado um pano de algodão limpo por leito, o qual era descartado após o uso. Antes dessa data, a limpeza das superfícies horizontais e de equipamentos era realizada com álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 1% para o chão.

Para fins de comparação, estabeleceu-se como período pré-intervenção as coletas feitas em janeiro e março, enquanto o período pós-intervenção consistiu nos meses de abril, maio, junho e julho.

### 12.3 Análise estatística

Para avaliar o impacto da intervenção realizada durante o período estudado, aplicou-se o Teste de proporções para duas amostras, utilizando o programa Stata/SE versão 9.1. Para as superfícies, os valores foram ajustados pelo número de *swabs* semeados nos períodos pré e pós-intervenção, uma vez que esse número variou entre as coletas, devido à ausência de paciente no leito e ao uso ou não dos equipamentos selecionados. Para cálculo das proporções esses números ainda foram ajustados para 100 equipamentos/mês (ex: 100 bombas infusoras/mês; 100 respiradores/mês). A comparação entre os períodos levou ainda em consideração a diferença na quantidade de meses testados em cada período.

### 12.4 Seleção de amostras bacterianas

Em um primeiro momento, colônias com características morfológicas diferentes foram semeadas em novas placas para obtenção de culturas puras, a partir das quais foi realizada a caracterização morfo-tintorial pelo método de Gram.

Apenas as amostras de bacilos Gram-negativos foram incluídas no estudo, sendo enriquecidas em *Brain-Heart Infusion Agar* (BHI ágar, Acumedia Manufacturers, Inc. Baltimore, Maryland) para estoque em *Skim Milk* (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) contendo glicerol a 10%, mantido a -20°C. A partir desses estoques foram realizados posteriormente os demais testes.

## 12.5 Identificação bacteriana

A princípio foi realizada uma triagem das amostras selecionadas através de testes fenotípicos convencionais:

- Avaliação do metabolismo Oxidação/ Fermentação: as amostras foram inoculadas em profundidade em dois tubos contendo meio semissólido OF segundo *Hugh Leifson* (Becton Dickinson, MO, EUA) acrescido de 1% de glicose (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) e incubadas a 35°C ± 2°C. Foram utilizados dois tubos para cada amostra, um deles acrescido de óleo mineral, para incubação em anaerobiose. Os micro-organismos fermentadores utilizaram a glicose em ambas as atmosferas de incubação. Bactérias não fermentadoras da glicose foram incapazes de utilizar a glicose no tubo contendo óleo mineral (de fermentação), acidificando somente o meio exposto ao ar, assim comprovando seu metabolismo oxidativo. A primeira leitura do teste foi realizada após 24h de incubação, e a segunda após 48h. Resultados somente foram considerados negativos quando não houve mudança no aspecto do meio após sete dias de incubação. Como controle positivo do teste foi utilizado a cepa *P. aeruginosa* ATCC® 27853 e como controle negativo, a cepa *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC® 13637.
- Mobilidade pelo meio *Motility* (Beckton Dickinson) suplementado de 0,01% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC, Merck, Darmstadt, Alemanha): com o auxílio de uma agulha, inoculou-se cada amostra com uma picada até ¾ da profundidade do meio. O crescimento bacteriano no meio semissólido é destacado pela viragem do TTC, que adquire tom avermelhado, evidenciando possível padrão de crescimento e mobilidade do micro-organismo. A leitura do teste foi realizada após 24h e 48h de incubação a 35°C ± 2°C. *P. aeruginosa*

ATCC® 27853 e *A. baumannii* ATCC® 19606 foram, respectivamente, os controles positivo e negativo.

- Descarboxilação dos aminoácidos lisina, arginina e ornitina (Sigma-Aldrich): uma alçada com inóculo denso de cada amostra foi inoculada em tubos contendo meio de Moeller (*Moeller's Decarboxylase Medium*, DIFCO) suplementado de 1% de cada um dos aminoácidos e cobertos por uma camada de óleo mineral, para incubação em anaerobiose. Além desses, foi utilizado um tubo controle, sem aminoácido. Os tubos foram incubados a 35°C ± 2°C por até sete dias. Os controles utilizados foram *P. aeruginosa* ATCC® 27853 e *Burkholderia cepacia* ATCC® 17759 e *Enterobacter cloacae* ATCC® 13047.
- Produção da enzima oxidase: uma alçada da amostra foi colocada sobre papel filtro e então expostos ao reagente tetrametil-p-fenileno diamina (INLAB, São Paulo, Brasil) solubilizado em água. A mudança de cor da massa bacteriana para púrpura de 10 a 30 segundos após a exposição ao reagente indicou produção de oxidase. Como controle positivo foi utilizada a cepa *P. aeruginosa* ATCC® 27853 e como controle negativo *A. baumannii* ATCC® 19606.

A partir dos resultados desses testes, as amostras foram divididas em quatro grupos: Enterobactérias, *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* e outros Bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF).

Para o grupo das enterobactérias, adicionalmente foram realizadas as seguintes provas para identificação das principais espécies:

- Produção de Indol, produção de H<sub>2</sub>S e mobilidade: as amostras foram inoculadas, em meio semissólido sulfeto-indol-mobilidade – SIM (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) e incubadas juntamente a uma fita impregnada com o reagente de Erlich (p-dimetilaminobenzoaldeído). Avaliou-se a produção de H<sub>2</sub>S pela mudança da cor do meio para negro. O indol, se produzido, interagiu com o reagente de Erlich, ocasionando mudança na cor da fita para rosa. Como controle positivo foi utilizada a cepa *Escherichia coli* ATCC® 25922 e como controle negativo a cepa *P. aeruginosa* ATCC® 27853. Para os BGNNF, esse meio foi utilizado apenas para avaliação da produção de indol.
- Utilização de citrato: as amostras foram inoculadas com uma estria simples, utilizando-se agulha microbiológica, em meio de Citrato de Simmons

(HIMEDIA, Paraná, Brasil) inclinado em tubo e incubadas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24h. Quando o citrato é utilizado, os produtos do metabolismo alcalinizam o meio, virando o indicador de pH azul de bromotimol de verde para azul. Foram utilizadas as cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> 13883 e *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 como controle positivo e negativo, respectivamente.

- Produção de urease: uma alçada de cada amostra foi semeada em caldo ureia de Christensen (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) e incubadas por 18- 24h a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em condições de aerobiose. A mudança de pH decorrente da hidrólise de ureia provoca a mudança da cor do indicador vermelho de fenol para um forte tom de rosa. Foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente, as cepas *Proteus vulgaris* ATCC<sup>®</sup> 13315 e *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922.
- Hidrólise de esculina (Merck, Darmstadt, Alemanha): cada amostra foi inoculada com alça microbiológica em ágar esculina inclinado e incubada a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . O teste foi avaliado após até 72h. A hidrólise produzida pelas amostras produtoras de esculinase causou a formação de um complexo marrom escuro ou negro. Os controles utilizados foram *K. pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> 13883 (positivo) e *P.aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853 (negativo).
- Produção de DNase: as amostras foram semeadas em *spot* numa placa de ágar DNase (Beckton Dickinson, Maryland, EUA).Após 24h de incubação a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , a superfície do meio foi coberta com ácido clorídrico 1N. Os micro-organismos produtores de DNase despolimerizaram o DNA molecular da fórmula, produzindo uma zona transparente em volta da área de crescimento. Foram utilizadas as cepas *S. maltophilia* ATCC<sup>®</sup> 13637 ou *Serratia marcescens* ATCC<sup>®</sup> 13880 como controles positivo e *B. cepacia* ATCC<sup>®</sup> 25416 ou *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 como controles negativos.
- Fermentação de lactose, sorbitol: os meios foram preparados em base de fermentação, com os carboidratos lactose (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) e sorbitol (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 1%. As amostras foram semeadas com uma alça microbiológica e incubadas por 18-24h a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Utilizou-se a cepa *K. pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> 13883 como controle positivo e *Proteus mirabilis* ATCC<sup>®</sup> 12453 como controle negativo para ambas as provas.

- Utilização do malonato: verifica a utilização do malonato (Merck, Darmstadt, Alemanha) como única fonte de carbono. Uma alçada com inóculo denso de cada amostra foi inoculada no caldo e incubada a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18-24h. A utilização altera o pH do meio, que muda da cor verde para a cor azul. Foram utilizadas as cepas *K. pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> 13883 e *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 como controle positivo e negativo, respectivamente.

O número de provas bioquímicas aplicadas na identificação das enterobactérias não foi suficiente para algumas espécies, estas foram identificadas pelo sistema automatizado VITEK 2<sup>®</sup> (bioMerieux), utilizando-se o cartão para Gram-negativos REF 21341.

Para o grupo dos BGNNF que não foram identificados apenas com as provas fenotípicas de triagem (incluindo *Pseudomonas* spp.), as seguintes provas foram aplicadas, além das citadas acima:

- Utilização dos carboidratos lactose, manitol, maltose, sacarose e xilose (Sigma-Aldrich): as amostras foram inoculadas em profundidade em meio semissólido OF segundo *Hugh Leifson* suplementado de 1% dos açúcares mencionados (exceto lactose, em que foi usado em concentração de 10%), e incubadas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . O teste foi avaliado a cada 24 horas por até sete dias de incubação, quando foi confirmado o resultado negativo. Controles positivos utilizados: *B. cepacia* ATCC<sup>®</sup> 17759 (lactose, manitol, xilose), *S. maltophilia* ATCC<sup>®</sup> 13637 (maltose, sacarose).
- Redução de nitrato e produção de gás a partir do nitrato: um inóculo denso de cada amostra foi semeado em caldo nitrato (Beckton Dickinson) contendo um tubo de *Durham* invertido. Os tubos foram incubados em aerobiose a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por período de 24h-48h, podendo ser prolongado até cinco dias de incubação. A visualização de bolhas dentro do tubo de *Durham* determinou a produção de gás a partir do nitrato do meio. Para avaliação de redução do nitrato, adicionou-se os reagentes A (solução de ácido sulfanílico em ácido acético) e B (solução de dimetilnaftilamina em ácido acético). A mudança da cor do segundo reagente de negro para a cor cereja indicou positividade para o teste. A cepa controle positivo destas provas foi *P. aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853, e como controle negativo foi usada a cepa *B. cepacia* ATCC<sup>®</sup> 17759.
- Hidrólise de gelatina: um inóculo denso das amostras foi feito em solução salina 0,9%. Seguiu-se a colocação de uma fita de filme de radiografia

(KODAK, São Paulo, Brasil). Os tubos foram incubados a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18-24h. A hidrólise da gelatina foi caracterizada quando da mudança da aparência da fita de verde opaco a translúcido. O controle deste teste foi realizado com a cepa *P. aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853 (positivo) e *B. cepacia* ATCC<sup>®</sup> 17759 (negativo).

- Produção de catalase: as amostras foram semeadas em caldo BHI (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA). Após 48 horas de incubação a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , foram expostas a peróxido de hidrogênio. Nas culturas de amostras produtoras de catalase, imediatamente apareceram bolhas de gás no meio. Como controle positivo, foi utilizada a cepa *Achromobacter xylosoxidans* ATCC<sup>®</sup> 27061, e como controle negativo, a cepa *Streptococcus pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> 6305.
- Tolerância a altas concentrações de NaCl: um pequeno inóculo de cada amostra foi semeado em dois diferentes tubos de caldo BHI, um livre de NaCl e o outro contendo 6% de NaCl. Os tubos foram incubados a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18-24h. Micro-organismos tolerantes a 6% de NaCl cresceram em ambos os tubos, enquanto aqueles intolerantes não cresceram no tubo contendo NaCl. Os controles utilizados foram as cepas *Pseudomonas putida* ATCC<sup>®</sup> 12633 (positivo) e *S. maltophilia* ATCC<sup>®</sup> 13637(negativo).
- Utilização de acetamida: semeio e incubação similares ao teste da utilização do citrato, porém executado com acetamida como fonte essencial de carbono em meio ágar acetato (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil). Os controles utilizados para esse teste foram *P. aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853 (positivo) e *S. maltophilia* ATCC<sup>®</sup> 13637(negativo).
- Produção de pigmentos (King, Ward & Raney, 1954): cada amostra foi semeada em dois tubos com os meios King A e King B (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) inclinados. O primeiro meio evidenciaria a produção de piocianina e piorrubina, enquanto o segundo facilitaria a detecção de pioverdina, quando visualizado sob luz ultravioleta. Os tubos foram incubados a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18-24h. A cepa *P. aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853 foi utilizada como controle positivo e a cepa *B. cepacia* ATCC<sup>®</sup> 25416, como controle negativo.

- Produção de H<sub>2</sub>S utilizando tiras de papel filtro impregnadas de acetato de chumbo (5%): as tiras de papel enegreceram ao reagir com o gás produzido após a incubação em meio SIM a 35°C ± 2°C por 18-24h, em condições de aerobiose. Foram utilizadas como controles as cepas *Proteus mirabilis* ATCC® 12453 (positivo) e *E. coli* ATCC® 25922 (negativo).

## 12.6 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

O teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) foi realizado pelo método de difusão em ágar de Kirby-Bauer, seguindo-se a metodologia de execução estabelecida pelo documento M2-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) e critérios de interpretação preconizados pelo documento M100-S23 (CLSI, 2013). Os discos de antimicrobianos (OXOID, Hampshire, RU) testados para cada grupo de microrganismos estão especificados no Quadro 1. As amostras padrão utilizadas foram *E. coli* ATCC® 25922 e *P. aeruginosa* ATCC® 27853.

Os discos das cefalosporinas ceftazidima, cefotaxima, cefepime e do monobactâmico aztreonam foram dispostos ao redor do disco contendo o inibidor de β-lactamases, a uma distância de 2cm cada, de modo a detectar fenotipicamente a produção de ESBLs para as enterobactérias (CLSI,2013). Como controle positivo, utilizou-se a cepa padrão *K. pneumoniae* ATCC® 700603.

Foram consideradas multirresistentes as amostras com resistência intermediária ou plena a pelo menos um agente de três ou mais classes de antimicrobianos, como proposto recentemente por um grupo de especialistas, na tentativa de padronizar as definições de multirresistência (Magiorakos *et al.*, 2012).

Quadro 1 - Discos de antimicrobianos testados para grupo de micro-organismos estudado

<b>Grupo</b>	<b>Discos de antimicrobianos testados</b>
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>	AMC (30µg), AMI (30µg), AMP (10µg), ATM (30µg), CAZ (30µg), CEF (30µg), CPM (30µg), CTX (30µg), CXM (30µg), CIP (5µg), GEN (10µg), IMP (10µg), MER (10µg), ERT (10µg), PPT (100/10µg), SUT (25µg)
<b><i>Acinetobacter spp.</i></b>	AMI (30µg), SAM (10/10µg), CPM (30µg), CAZ (30µg), CTX (30µg), CIP (5µg), GEN (10µg), IMP (10µg), MER (10µg), PPT (100/10µg), SUT (25µg)
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	AMI (30µg), ATM (30µg), CPM (30µg), CAZ (30µg), CIP (5µg), GEN (10µg), IMP (10µg), MER (10µg), PPT (100/10µg)

Legenda: AMC- amoxicilina com ácido clavulânico; AMI- amicacina; AMP- ampicilina; ATM- aztreonam; CAZ- ceftazidima; CEF- cefalotina; CPM- cefepime; CTX- cefotaxima; CXM- cefuroxima; CIP- ciprofloxacina; ERT- ertapenem; GEN- gentamicina; IMP- imipenem; MER- meropenem; PPT- piperacilina com tazobactam; SAM- ampicilina com sulbactam; SUT- sulfametoxazol/ trimetoprim.

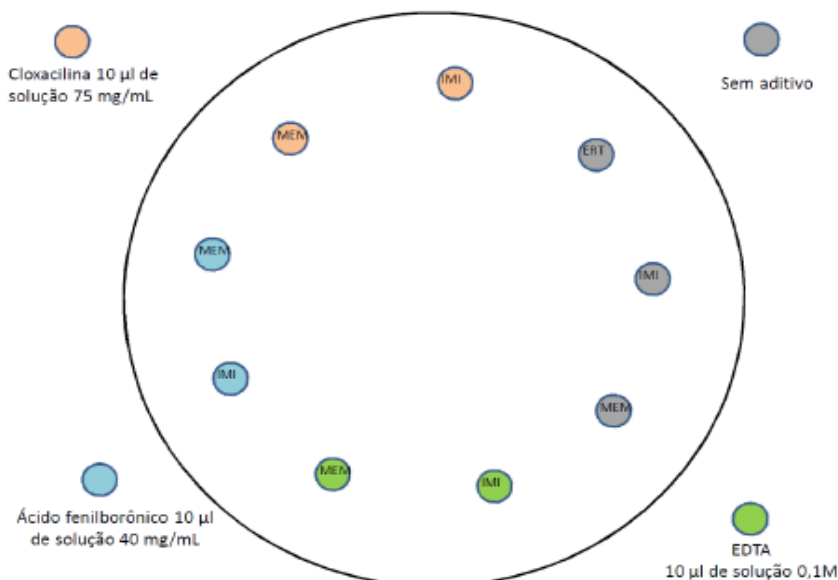
Fonte: A Autora, 2015

### 12.7 Detecção fenotípica de carbapenemases em enterobactérias

As amostras de enterobactérias que apresentaram resistência ou sensibilidade reduzida (halo  $\leq$  22 mm) a pelo menos um dos carbapenêmicos, (imipenem, meropenem ou ertapenem), foram submetidas ao método de triagem fenotípica para produção de carbapenemases de acordo com a Nota Técnica nº1 da Anvisa (ANVISA, 2013). O teste consiste na observação da variação do halo entre os discos dos carbapenêmicos imipenem e meropenem puros e adicionados de inibidores e potenciadores de enzimas carbapenemases de diferentes classes moleculares: classe A (ex: KPC), classe B- as metalo- $\beta$ -lactamases (MBL) (ex: IMP, VIM, SPM, NDM) e classe C (ex: CMY). Já a produção de enzimas de classe D (ex: OXA-48), pode ser inferida pela não observação de alteração com nenhum dos compostos utilizados (Figura 3).



Figura 3 - Esquema para aplicação de discos de antimicrobianos para detecção de carbapenemases em enterobactérias.



Legenda: ERT- ertapenem, IMP- imipenem, MEM- meropenem.  
 Fonte: Nota Técnica nº1, ANVISA, 2013.

Para as enterobactérias não-CESP, amostras com diferença de diâmetro igual ou superior a 5 mm para o carbapenêmico (imipenem ou meropenem) com EDTA em relação ao carbapenêmico sem EDTA são considerados potenciais produtores de MBL. Amostras com diferença de diâmetro de halo de inibição  $\geq 5$ mm apenas com ácido fenilborônico (AFB) deverão ser considerados produtores de KPC. Os isolados com diferença de diâmetro de halo de inibição  $\geq 5$ mm com AFB e cloxacilina (CLOXA) simultaneamente, são considerados produtores de AmpC plasmidial e deficientes em porinas. Já amostras com diferença de diâmetro de halo de inibição inferior a 5mm com os três compostos testados podem ser mutantes deficientes em porinas ou produtores de OXA-48.

Para os isolados do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*) são considerados apenas os resultados do imipenem e do meropenem para o teste com o EDTA, para detecção da produção de MBL. Devido à ocorrência de falsa positividade para o teste com o AFB para detecção da produção de KPC, amostras intermediárias ou resistentes para imipenem e/ou meropenem e negativos para o

teste de triagem podem ser produtores de outras carbapenemase (KPC ou OXA- 48) ou mutantes deficientes em porinas. Uma vez que a ocorrência de falso positivo no teste de detecção de KPC é alta para esse grupo, recomenda-se o teste molecular por PCR.

Como controles positivos de KPC, MBL, OXA-48 e hiperprodução de AmpC plasmidial foram utilizadas, respectivamente, as cepas: *K. pneumoniae* AP01 e *E. cloacae* NDM, da coleção de bactérias do Instituto Oswaldo Cruz, gentilmente cedidas pela Dra. Ana Paula D'Allincourt Carvalho-Assef; a cepa *K. pneumoniae* OXA-48 e a cepa *E. coli* CMY-2-like, gentilmente cedidas pelo Dr. Jorge Sampaio, da Universidade de São Paulo (USP). O controle negativo utilizado foi *E. coli* ATCC® 25922.

## 12.8 Detecção molecular de genes de resistência

Para as reações de PCR destinadas à detecção dos genes de resistência mais comuns em cada grupo de micro-organismos estudados, o DNA genômico foi obtido através de lise térmica. As amostras foram suspensas em 600µL de água Milli-Q em tubos tipo *ependorfs* de 1,5mL, que foram submetidos a uma temperatura de aproximadamente 100°C por 10 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto (HERMLE, Z 233M-2) e uma alíquota de 200µL do sobrenadante foi armazenada a -20°C para posterior utilização.

As reações foram executadas nos termocicladores *Eppendorf Mastercycler gradient*® e *Applied Biosystems* modelo *GeneAmp*® *PCR System 9700*. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (*UltraPure*™ *Agarose*- Invitrogen) a 1,2%, adicionado de 2,5µL do corante SYBER® *Safe* por 30 minutos, em cuba horizontal (Horizon 11-14, GIBCO BRL, Life Technologies) com solução de tampão TBE 1X (EDTA 0,5M pH8,0; Trisma base 1,0mM pH 8,0; água Milli-Q).

Os géis foram visualizados através de um transiluminador de luz ultravioleta e um sistema digital de captação de imagens (*UVP BioImaging Systems DIGI DOC-IT System*. Upland, CA, EUA). O tamanho dos produtos de amplificação foi estimado

por comparação com padrão de peso molecular (*Ladder* 100pb, Invitrogen), através da ferramenta específica do *software* de captação de imagens.

#### 12.8.1 PCR multiplex para detecção de Oxacilinas

A presença dos genes de carbapenemases *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub> foi investigada através de PCR multiplex segundo Woodford *et al.* (2006), com alterações de Higgins, Lehmann e Seifert (2010). Os iniciadores são apresentados na Tabela 2. As amostras de *A. baumannii* foram identificadas pela detecção do gene *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, intrínseco à espécie.

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições, para um volume final de 25µl por reação: 5µL de Tampão de PCR 10X sem corante, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5µL do mix de desoxirribonucleotídeos (dNTP) a 10mM (Fermentas), 20pmol de cada iniciador, 0,25U de *Platinum*<sup>®</sup>*Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) e 1µL do DNA genômico.

Os parâmetros de amplificação utilizados para a PCR multiplex dos genes de OXA foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 25 seg, anelamento a 52°C por 40 seg e alongamento a 72°C por 50 seg cada. Por fim, uma extensão a 72°C, por 6 min (Woodford *et al.*, 2006).

Tabela 2 - Relação dos iniciadores utilizados para detecção dos genes de oxacilinases em *Acinetobacter* spp.

Alvo		Iniciadores	Referência	Fragmento
OXA-23-like	F	5-GATCGGATTGGAGAACCAGA	Woodford <i>et al.</i> , 2006	501pb
	R	5-ATTTCTGACCGCATTTCAT		
OXA-51-like	F	5-TAATGCTTTGATCGGCCTTG	Woodford <i>et al.</i> , 2006	353pb
	R	5-TGGATTGCACTTCATCTTGG		
OXA-24-like	F	5-GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	Woodford <i>et al.</i> , 2006	246pb
	R	5-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
OXA-58-like	F	5-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	Woodford <i>et al.</i> , 2006	599pb
	R	5-CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
OXA-143	F	5'-TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	Higgins Lehmann e Seifert, 2010	149pb
	R	5'-TAATCTTGAGGGGGCCAACC		

Fonte: A Autora, 2015

A cepa utilizada como controle para os genes *bla*<sub>OXA-51</sub> e *bla*<sub>OXA-23</sub> foi a cepa *A. baumannii* CCBH 2941, da coleção de bactérias do Instituto Oswaldo Cruz, gentilmente cedidas pela Dr<sup>a</sup>. Marise Dutra Asensi. As cepas controle para os genes *bla*<sub>OXA-24</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub> foram gentilmente cedidas pelas Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Gales (Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP). Para o gene *bla*<sub>OXA-143</sub>, a cepa *A. baumannii* 804/08 foi cedida pelo Dr<sup>o</sup> Nilton Lincopan (USP).

### 12.8.2 PCR para detecção de ESBLs e KPC

A presença dos genes *bla*<sub>TEM-like</sub> e *bla*<sub>CTX-like</sub> foi investigada nas enterobactérias através de PCR simples, com os iniciadores especificados abaixo

(Tabela 3). A PCR para o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> foi realizada apenas para aquelas amostras que foram positivas para produção dessa carbapenemase, segundo o teste fenotípico.

Tabela 3- Relação dos iniciadores utilizados para detecção dos genes de ESBL e KPC no DNA genômico das enterobactérias.

Gene alvo		Sequência (5'-3')	Amplicon	Referência
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	F	GCGGAACCCCTSTTTG	859pb	Hasman <i>et al.</i> , 2005
	R	ACCAATGCTTAATCAGTGAG		
<i>bla</i> <sub>CTX</sub>	F	ATGTGCAGYAACCAGTAARGTKATGGC	593pb	Mulvey <i>et al.</i> , 2003
	R	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG		
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	F	TGTCACTGTATCGCCGTC	1.011pb	Yigit <i>et al.</i> , 2001
	R	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		

Fonte: A Autora, 2015

As reações de PCR para *bla*<sub>CTX-like</sub> e *bla*<sub>TEM-like</sub> foram realizadas nas seguintes condições, para um volume final de 25µl por reação: 2,5µL de Tampão de PCR 10X sem corante, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5µL do mix de desoxirribonucleotídeos (dNTP) a 10mM (Fermentas), 20pmol de cada iniciador, 2,5U de *Platinum® Taq DNAPolymerase* (Invitrogen) e 1µL do DNA genômico. Para a reação do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> utilizou-se 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>.

Para a detecção de cada gene foi utilizado um programa de amplificação específico, de acordo com a temperatura ideal de anelamento dos diferentes iniciadores (Tabela 4). Utilizou-se como controle positivo a cepa *K. pneumoniae* AP01, que possui os genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>KPC</sub>.

Tabela 4 - Condições de ciclagem das reações para detecção de ESBLs e KPC.

Condições	Gene alvo		
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>
<b>Desnaturação inicial</b>	94°C - 3 min	94°C - 5 min	94°C - 3 min
<b>Desnaturação</b>	94°C - 1 min	94°C - 45 seg	94°C - 1 min
<b>Anelamento</b>	51°C - 1 min	61°C - 45 seg	50°C - 1 min
<b>Alongamento</b>	72°C - 1 min	72°C - 45 seg	72°C - 1 min
<b>Extensão</b>	72°C - 10 min	72°C - 10 min	72°C - 10 min
<b>Ciclos</b>	35	30	35

Fonte: A Autora, 2015

### 12.8.3 PCR do gene *rpoB*

A PCR para o gene *rpoB* foi realizada para uma cepa de Anb isolada do ar e portadora do *bla*<sub>OXA-58</sub>, denominada *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 (como descrito no item 13.6), para identificação da espécie. Os iniciadores utilizados foram Ac696F (TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG) e Ac1093R (CMACACCYTTGTTMCCRTGA), as condições da reação foram as mesmas descritas para os genes de ESBL e os parâmetros de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 52°C por 30 seg e alongamento a 72°C por 1 min cada. Por fim, uma extensão a 72°C por 7 min (Gundi *et al.*, 2009).

## 12.9 Purificação do DNA

Os produtos de amplificação dos genes *bla*<sub>OXA-58</sub> e *rpoB* foram purificados através do *kit Illustra GFX PCR e Gel Band Purification* (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA purificado foi submetido à eletroforese para verificação da qualidade e, posteriormente, conservado a -20°C até a realização da reação de sequenciamento.

## 12.10 Sequenciamento dos genes *bla*<sub>OXA-58</sub> e *rpoB*

O método de sequenciamento foi aplicado apenas para a amostra *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 isolada nas etapas anteriores (como descrito em resultados, item 13.6) em que houve amplificação do gene *bla*<sub>OXA-58</sub>. O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação com dideoxynucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977) utilizando iniciadores específicos descritos acima (itens 12.8.1 e 12.8.3) e o *kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

A reação continha 2µL de DNA (180ng/µL), 5µL de água Mili-Q, 1,5µL de tampão de *BigDye* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), 0,5µL de *BigDye* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e 1,0 pmoles/µL do iniciador em cada poço de microplaca de PCR (96 poços, com saia elevada, Axygen). A reação foi realizada em triplicata para cada iniciador e após uma centrifugação rápida, a placa foi submetida a uma reação de PCR para sequenciamento, com um ciclo inicial de 96°C/1min e 35 ciclos de 96°C/15s, 50°C/15s e 60°C/1min e 30seg, em termociclador Veriti 96 *Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Seguindo as orientações do fabricante, a rampa de temperatura foi ajustada, no intuito de impedir mudança brusca de temperatura (>1°C/seg), evitando assim que a leitura dos nucleotídeos fosse prejudicada.

Posteriormente o DNA marcado foi precipitado, para isto foi adicionado a cada poço da microplaca 30µL de etanol absoluto e 2,5µL de EDTA (0,125mM). Em seguida foi feita uma centrifugação a 700 rpm durante 45 min a 4°C, o líquido foi

descartado e a placa passou por uma centrifugação invertida até atingir 700 rpm, quando então foi adicionado 30µL de etanol 70% e a placa foi incubada por 15 min. Posteriormente a microplaca foi centrifugada invertidamente por 1 min a 700 rpm e colocada em ambiente escuro por 1 hora para secagem.

Em seguida, as sequências foram lidas com auxílio do sistema *Genetic Analyzer 3500 8-capillary* (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

#### 12.10.1 Análise das sequências dos genes *rpoB* e *bla*<sub>OXA-58</sub>

Primeiramente foram feitos alinhamentos das sequências do gene *bla*<sub>OXA-58</sub> e das sequências parciais do gene *rpoB* com os dados do *GenBank*, por intermédio da ferramenta BLAST, presente na base de dados do NCBI, considerando-se a identificação em nível de espécie confiável a partir de percentuais iguais ou superiores a 99% de similaridade entre a amostra estudada e as sequências constantes na base de dados.

#### 12.11 **Identificação da espécie por espectrometria de massa pelo tempo de voo e dessorção/ionização a laser assistida por matriz – MALDI-TOF MS**

A identificação por espectrometria de massa de proteínas foi feita no equipamento MALDI Biotyper Microflex LT (Brüker Daltonics, Bremen, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Com agulhas microbiológicas, duas réplicas da amostra foram transferidas em esfregaço para os espaços da placa metálica de 96 poços utilizada para inserir amostras no aparelho. Após a secagem dos esfregaços em ar, estes foram cobertos com 1µL com uma matriz de corrida composta de ácido  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic (CHCA) e uma solução orgânica de acetonitrila (50%) e ácido trifluoroacético (2,5%), indicada pelo fabricante, seguido de nova etapa de secagem.

A placa contendo a amostras foi então inserida no equipamento de análise e comandados pelo *software* de controle FlexAnalysis (versão 3.3 – Brüker Daltonics,



Bremen, Alemanha) para identificação da mesma. O sistema então procedeu com a geração de espectros da relação massa/carga das proteínas através da medição do tempo de voo das amostras quando ionizadas após 240 tiros de laser e os confrontou com seu banco de dados (Maldi Biotyper versão 3.1 – Brüker Daltonics, Bremen, Alemanha), apontando os dois micro-organismos mais prováveis e seus respectivos índices de precisão (*scores*).

Os resultados gerados foram classificados de acordo com as seguintes recomendações do fabricante:

- a) *score* acima de 2300: alta probabilidade de identificação em espécie;
- b) *score* de 2000 a 2299: identificação segura em nível de gênero e provável identificação em espécie;
- c) *score* de 1700 a 1999: provável identificação em nível de gênero;
- d) *score* 0000 a 1699: identificação inadequada.

Os espectros obtidos para cada uma das réplicas da amostra *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 avaliadas foram inspecionados e unificados. O espectro único obtido foi utilizado para suplementação da base de dados do *software* MALDI Biotyper. Em seguida, um dendrograma MSP (*main-spectrum*) foi construído, utilizando os espectros de espécies de *Acinetobacter* disponíveis no banco de dados (MALDI Biotyper). O dendrograma foi criado pelo método padrão de criação de dendrogramas MSP do *software*, em que os valores de distância são relativos e são normalizados para um valor máximo de 1.000 (Brüker Daltonics, Bremen, Alemanha).

#### 12.12 Sequenciamento do genoma de *Acinetobacter não-baumannii*

O DNA da amostra *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, isolada durante uma coleta de ar, foi purificado segundo método descrito no item 12.9 e utilizado para a preparação de um biblioteca genômica através do kit *Nextera DNA Sample Preparation*. Esse kit permite que o DNA seja fragmentado e marcado simultaneamente. Em seguida, oligonucleotídeos adaptadores são ligados aos fragmentos obtidos para possibilitar a amplificação e o seqüenciamento de cada um deles.

O genoma da amostra *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 foi então sequenciado com o sistema *Illumina MiSeq*, utilizando o *MiSeq Reagent Kit v2*, com 300 ciclos. As sequências obtidas foram montadas em forma de *contigs* através do *software* SPAdes 2.5.0 (<http://bioinf.spbau.ru/spades>) (Nurk *et al.*, 2013). O genoma montado foi anotado no servidor RAST (*Rapid Annotations using Subsystems Technology*; <http://www.theseed.org>) (Aziz *et al.*, 2008; Overbeek *et al.*, 2014) para identificar e atribuir função aos genes codificadores de proteínas e genes de RNAs ribossomais (rRNA) e RNAs transportadores (tRNA).

A ferramenta de comparação entre genomas anotados no bioservidor RAST, baseada na similaridade entre as sequências de aminoácidos, utilizando o BLAST (Aziz *et al.*, 2008), também foi aplicada para o genoma analisado. Os genomas de espécies geneticamente relacionadas foram anotados no bioservidor para comparação.

Todas as sequências codificadoras identificadas pelo RAST, associadas ou não a funções já descritas, foram submetidas a um BLAST de nucleotídeos para sequências com alta similaridade - MEGABLAST (E-value,  $10e^{-5}$ ; identidade 50%; cobertura 50%), para verificar se a sequência ou sequências próximas já haviam sido descritas no Banco de Dados de Nucleotídeos, e a um BLAST de proteínas (E-value,  $10e^{-5}$ ; identidade 30%; cobertura 50%) para proteínas não redundantes do Banco de Dados de Proteínas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A ferramenta InterProScan, disponibilizada pelo Instituto Europeu de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Jones *et al.*, 2014; Mitchell *et al.*, 2014) também foi utilizada para identificar domínios proteicos em todas as sequências codificadoras.

#### 12.12.1 Identidade média de nucleotídeos (ANI)

Realizou-se a comparação do genoma obtido com genomas completos de diversas espécies do gênero *Acinetobacter* disponíveis no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) através da técnica de identidade média de nucleotídeos (ANI) (Goris *et al.*, 2007). Utilizou-se duas plataformas de comparação disponíveis na internet, baseadas no mesmo cálculo, EZGenome

(<http://www.ezbiocloud.net/ezgenome/ani>) e Enve-omics (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>).

### 12.12.2 Filogenia baseada em Polimorfismos de Nucleotídeo Único

Uma árvore filogenética foi construída para a cepa de *Acinetobacter* não-*baumannii* a partir dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) entre genomas de espécies do gênero *Acinetobacter*, através do servidor snpTree 1.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/snpTree/>). Utilizou-se o genoma de *A. baumannii* ATCC® 17897 e adotou-se as configurações pré-estabelecidas no servidor. O dendrograma foi construído a partir do alinhamento dos SNPs, através do método de similaridade máxima (*maximum likelihood*). Os genomas utilizados para análise da filogenia dessa cepa foram os mesmos usados para a metodologia do ANI.

### 12.12.3 Análise do Genoma

Para aprofundar o conhecimento do genoma em estudo, diversas ferramentas disponibilizadas pelo Centro de Epidemiologia de Genomas (*Center for Genomic Epidemiology* - <http://www.genomicepidemiology.org/>) foram aplicadas. Para identificar genes de resistência a antimicrobianos adquiridos, utilizou-se o ResFinder versão 2.1, com as configurações pré-definidas (Zankari *et al.*, 2012). O PathogenFinder, por sua vez, busca o potencial patogênico de uma genoma através da identificação de genes conhecidamente relacionado à patogenicidade (Cosentino *et al.*, 2013).

A fim de identificar famílias de sequências de inserção em regiões específicas do genoma, a ferramenta IS Finder (<http://www-is.biotoul.fr/>) foi empregada para *contigs* de maior relevância dentro do genoma (Siguier *et al.*, 2006). Através do servidor PHAST (*Phage Search Tool*) (<http://phast.wishartlab.com/>) (Zhou *et al.*,

2011) realizou-se a busca de profagos completos ou incompletos no genoma estudado.

### 12.13 Determinação da concentração inibitória mínima para antimicrobianos e metais pesados

Para confirmar a expressão fenotípica de alguns genes de resistência encontrados no genoma, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo os critérios de interpretação do CLSI (2014) para os seguintes antimicrobianos: piperacilina, ácido clavulânico, ceftazidima, imipenem, meropenem, doripenem, ampicacina, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacina, tetraciclina, doxiciclina, minociclina, tigeciclina, netilmicina, colistina e sulbactam (Sigma- Aldrich, St. Louis, EUA). Utilizou-se como cepas controle *E. coli* ATCC® 25922 e *P. aeruginosa* ATCC® 27853. Para fins de comparação, utilizou-se ainda a cepa *A. baumannii* ATCC® 19606.

A resistência a metais pesados foi verificada por microdiluição em caldo, da mesma maneira como foi realizada para antimicrobianos (CLSI, 2014), para cobalto, cádmio, cromo, cobre, arsênico e zinco (Akinbowale *et al.*, 2007). Já a CIM para telurito foi verificada por diluição seriada em placa, com concentrações crescentes variando de 1 a 1.024 µg/mL (Taylor *et al.*, 2002). Os sais de metais utilizados estão relacionados na Tabela 5, todos fabricados e comercializados pela Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Para interpretação dos resultados usou-se os valores estabelecidos para a cepa referência *E. coli* K12 (Akinbowale *et al.*, 2007) e os valores adotados por Taylor e colaboradores (2002). Os pontos de corte utilizados para classificar a cepa como resistente foram:  $\geq 100$  µg/mL para cádmio,  $\geq 200$  µg/mL para cobre, arsênico e zinco,  $\geq 400$  µg/mL para cobalto e  $\geq 800$  µg/mL para o cromo. Já para telurito, ao ponto de corte foi  $> 128$  µg/mL.

Tabela 5 - Sais de metais utilizados para microdiluição em caldo e diluição seriada em placa.

Nome	Fórmula
Cloreto de Cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Telurito de Potássio hidratado	$\text{K}_2\text{O}_3\text{Te} \cdot \text{XH}_2\text{O}$
Cloreto de Cádmiio hidratado	$\text{CdCl}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$
Nitrato de Cromo nonahidratado	$\text{CrN}_3\text{O}_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4$
Arsenato de Sódio dibásico heptahidratado	$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Sulfato de Zinco heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Fonte: A Autora, 2015.

## 13 RESULTADOS

### 13.1 Contagem de colônias da coleta de ar

Para a análise quantitativa das coletas do ar, utilizou-se a contagem realizada nas placas de ágar sangue, por oferecerem uma melhor representação da comunidade microbiana no ar, uma vez que permitem o crescimento de microorganismos nutricionalmente mais exigentes. De forma geral, os meses de janeiro e maio apresentaram valores bastante elevados nas contagens de colônias totais (todos os morfotipos presentes) (Figura 4). Em contrapartida, o mês de julho apresentou a menor contagem de colônias dentre os meses estudados. Houve uma redução da quantidade de colônias obtidas nas coletas ao longo dos meses, entretanto essa redução não foi constante (Tabela 6).

Figura 4 – Crescimento microbiano em placa de ágar sangue representativa da coleta de ar do CTI Geral do HUPE.



Fonte: A Autora, 2015

Para o ponto de coleta 1, o número de colônias manteve-se relativamente constante entre janeiro e maio, com exceção de março, quando não foi realizada coleta, pois o leito estava vazio. Para os meses de junho e julho houve uma queda maior que 50% no número de colônias obtidas (Tabela 6).

No mês de janeiro foi realizada a coleta do ponto 2 com o leito vazio e pouco depois da realização de uma limpeza terminal (pós alta). Ainda assim, a contagem obtida na coleta desse mês foi a segunda maior para esse ponto, indicando uma baixa influência da limpeza realizada na qualidade de ar coletado. Assim como ocorreu para o ponto de coleta 1, houve redução maior que 50% na contagem de colônias de junho, em relação ao mês anterior. Também foi observada uma redução acentuada entre os meses de maio e junho para o ponto 7.

Tabela 6 - Contagem total de colônias obtidas nas placas de ágar sangue a partir das coletas de ar ao longo das seis coletas no CTI Geral.

<b>Ponto de coleta</b>	<b>JAN</b>	<b>MAR</b>	<b>ABR</b>	<b>MAI</b>	<b>JUN</b>	<b>JUL</b>	<b>Total</b>
<b>Leito 1</b>	103	0*	105	100	24***	37	369
<b>Leito 2</b>	92**	58	105	77	19	0*	351
<b>Leito 3</b>	76	26	44	36	52	36	270
<b>Leito 4</b>	73	43	32	61	32	17	258
<b>Leito 5</b>	0*	50	55	50	12	28	195
<b>Leito 6</b>	42	49	66	374***	17	51***	599
<b>Leito 7</b>	121	86	73	151	45	12	488
<b>Posto de enfermagem</b>	83	36	134	49	104	27	433
<b>Sala de reuniões</b>	73	57	33	34	168 <sup>1</sup>	34 <sup>2</sup>	399
<b>Saída do expurgo</b>	55	46	129	110	98	156	594

Notas: Valores ajustados segundo recomendações do fabricante do aparelho MAS-100, representados em UFC/m<sup>3</sup>.

Legenda: \*-Leito vazio; \*\*-Leito vazio após limpeza terminal; \*\*\*- Uma enfermeira no leito durante a coleta; <sup>1</sup>- Presença de até 4 pessoas na mesa durante a coleta; <sup>2</sup>- Uma pessoa na mesa durante a coleta.

Fonte: A Autora, 2015

Ao contrário do que aconteceu para os demais pontos de coleta, o ponto 10 apresentou os menores valores de contagem das colônias nos meses iniciais de coleta - em janeiro e março- e esses valores aumentaram nos meses seguintes, sendo os maiores valores registrados em abril e julho.

A presença de pessoas no ponto de coleta, realizando procedimentos ou manipulando o paciente, interferiu diretamente no número de colônias recuperadas, aumentando em aproximadamente quatro vezes o número de colônias obtidas.

### 13.2 Identificação fenotípica

Foram recuperadas dos diversos pontos de coleta do ambiente do CTI Geral 207 amostras de BGN, das quais 141 (68,12%) foram bastonetes Gram-negativos não fermentadores (BGNNF) e 66 (31,88%) foram fermentadores da família *Enterobacteriaceae*.

Em todas as coletas, o número de amostras de BGNNF isolado foi superior ao número de enterobactérias, com exceção do mês de julho, em que a mesma quantidade foi encontrada para os dois grupos. O número de amostras de BGNNF isoladas diminuiu gradativamente ao longo das coletas, de forma que na última coleta, a quantidade de amostras de BGNNF isoladas foi quatro vezes menor que os valores do mês de janeiro (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição das amostras de BGN isoladas a partir da coleta do ar e das superfícies do CTI Geral.

Total de amostras	JAN	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	Total
<b>BGNNF</b>	32	35	33	20	13	8	<b>141</b>
<b>Enterobactérias</b>	19	11	8	14	6	8	<b>66</b>
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>46</b>	<b>41</b>	<b>34</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>207</b>

Nota: BGNNF: Bacilos Gram-negativos não fermentadores  
Fonte: A Autora, 2015



Dentre as amostras de BGNNF, 68 (48,23%) pertenceram ao gênero *Pseudomonas*, sendo a espécie mais frequente a *P. aeruginosa* (51 amostras), e 29 (20,57%) ao gênero *Acinetobacter*. Para as demais amostras de BGNNF (n=44; 31,21%), apenas algumas espécies puderam ser identificadas através de testes fenotípicos, com apenas um representante de cada: *Brevundimonas diminuta*, *Moraxella osloensis*, *Neisseria elongata*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Roseomonas gilardii* (Tabela 8). Embora o gênero *Neisseria* seja predominantemente composto por cocos Gram-negativos, a espécie *Neisseria elongata* apresenta-se como bacilo ou coco-bacilo à coloração de Gram e, portanto, foi incluída no grupo dos BGNNF.

Ao todo, oito espécies e dois gêneros de BGNNF (*Acinetobacter* e *Pseudomonas*) foram identificados pelos métodos fenotípicos empregados, incluindo *Pseudomonas stutzeri* e *Pseudomonas luteola*.

Tabela 8 - Espécies de BGNNF identificadas a partir das coletas de ar e superfícies do CTI Geral do HUPE.

BGNNF	Nº de amostras	Percentual (%)	
		BGNNF	Total de amostras
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51	36,17	24,64
<i>Acinetobacter</i> spp.	29	20,57	14,01
<i>Pseudomonas</i> spp.	14	9,93	6,76
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2	1,42	0,97
<i>Pseudomonas luteola</i>	1	0,71	0,48
<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	0,71	0,48
<i>Moraxella osloensis</i>	1	0,71	0,48
<i>Neisseria elongata</i>	1	0,71	0,48
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,71	0,48
<i>Roseomonas gilardii</i>	1	0,71	0,48
Não identificados	39	27,66	18,84
<b>Total</b>	<b>141</b>	<b>100,00</b>	<b>68,12</b>

Nota: BGNNF: Bacilos Gram-negativos não fermentadores  
 Fonte: A Autora, 2015

Para as enterobactérias, as espécies mais frequentes foram *Klebsiella pneumoniae* (n=16; 24,24%), *Serratia marcescens* (n=15; 22,73%) e Complexo *Enterobacter cloacae* (CEC) (n=10; 15,15%). Algumas amostras foram identificadas pelo sistema automatizado VITEK 2®, como *Raoutella ornithinolytica* (n=2), *Kluyvera* sp. (n=1) e *Pantoea* sp. (n=1) (Tabela 9).

Tabela 9 - Espécies de enterobactérias identificadas a partir das coletas de ar e superfícies do CTI Geral do HUPE.

Enterobactérias	Nº de amostras	Percentual (%)	
		Enterobactérias	Total de amostras
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	24,24	7,73
<i>Serratia marcescens</i>	15	22,73	7,25
Complexo <i>E. cloacae</i>	10	15,15	4,83
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8	12,12	3,86
<i>Citrobacter freundii</i>	5	7,58	2,42
<i>Escherichia coli</i>	3	4,55	1,45
<i>Pantoea agglomerans</i>	2	3,03	0,97
<i>Raoutella ornithinolytica</i>	2	3,03	0,97
<i>Citrobacter koseri</i>	1	1,52	0,48
<i>Enterobacter</i> spp.	1	1,52	0,48
<i>Kluyvera</i> spp.	1	1,52	0,48
<i>Pantoea</i> sp.	1	1,52	0,48
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1,52	0,48
<b>Total</b>	<b>66</b>	<b>100,00</b>	<b>31,88</b>

Fonte: A Autora, 2015

### 13.3 Distribuição por ponto de coleta

#### 13.3.1 Superfícies

Um total de 123 BGN foi isolado das diversas superfícies selecionadas no CTI Geral. Dentre estes, 68 (55,28%) foram identificados como BGNNF e 55 (44,72%) como enterobactérias. Os dois primeiros meses estudados apresentaram maior isolamento de BGN das superfícies - 32 amostras em janeiro e 34 em março. O número caiu nos meses seguintes, com um pequeno aumento no mês de julho, em relação a junho (Tabela 10).

Tabela 10 - Distribuição das amostras de BGN isoladas a partir da coleta das superfícies do CTI Geral.

<b>Superfícies</b>	<b>JAN</b>	<b>MAR</b>	<b>ABR</b>	<b>MAI</b>	<b>JUN</b>	<b>JUL</b>	<b>Total</b>
<b>BGNNF</b>	14	25	11	6	6	6	<b>68</b>
<b>Enterobactérias</b>	18	9	6	11	3	8	<b>55</b>
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>9</b>	<b>14</b>	<b>123</b>

Legenda: BGNNF - Bacilos Gram-negativos não fermentadores  
Fonte: A Autora, 2015

O número de *swabs* coletados em cada sítio variou de acordo com a presença de paciente no leito e a utilização de todos os equipamentos avaliados. Dentre os sítios de coleta escolhidos para cada ponto de coleta, o isolamento de BGN foi mais frequente nas quatro pias avaliadas (57,72%). A proporção entre o número de amostras de BGN isoladas e o número de *swabs* coletados foi de aproximadamente 3 para as pias; 0,5 para os carrinhos de enfermagem e respiradores; e 0,3 para as bombas infusoras (Tabela 11). Não houve isolamento de BGN da bancada de preparo de medicamentos do posto de enfermagem e na mesa de reuniões.

Tabela 11 - Distribuição das amostras de BGN, número de *swabs* coletados e relação entre o número de *swabs* e o número de amostras em cada sítio de coleta de superfícies do CTI Geral

Sítios de coleta	Nº de amostras	Percentual (%)	Nº de <i>swabs</i>	Nº amostras/ Nº <i>swabs</i>
Pias	71	57,72	24	3
Carrinho de enfermagem	20	16,26	39	0,5
Bombas infusoras	17	13,82	63	0,3
Respirador	15	12,20	32	0,5
<b>Total</b>	<b>123</b>	<b>100</b>	<b>158</b>	<b>-</b>

Fonte: A Autora, 2015

### 13.3.1.1 Carrinhos de enfermagem

Não houve diferença expressiva no isolamento de enterobactérias (n=11; 55%) e BGNNF (n=9; 45%) neste sítio de coleta. A espécie *K. pneumoniae* foi a mais isolada, com seis amostras (30%), seguida pela *P. aeruginosa*, com cinco (25%) amostras. As três amostras de *Acinetobacter* spp. foram isoladas apenas em março e uma *Moraxella osloensis*, em janeiro. Ao todo, seis espécies de enterobactérias foram recuperadas desse sítio: *Citrobacter koseri*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *S. marcescens*, mas apenas a *K. pneumoniae* foi isolada em mais de uma coleta (Tabela 12).

A redução observada no isolamento tanto de BGNNF quanto de enterobactérias entre os períodos pré e pós-intervenção não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Entretanto, quando foram analisadas individualmente as espécies, observamos que a redução foi significativa para *K. pneumoniae* ( $p = 0,03$ ) e *Acinetobacter* spp. ( $p = 0,02$ ).

Tabela 12 - Amostras de BGN isoladas a partir dos Carrinhos de enfermagem de cada leito ao longo de seis meses de coleta.

Micro-organismos	JAN	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	Total	%
<b>BGNNF</b>								
<i>P. aeruginosa</i>	1	2	2	0	0	0	5	25
<i>Acinetobacter spp.</i>	0	3	0	0	0	0	3	15
<i>Moraxella osloensis</i>	1	0	0	0	0	0	1	5
<b>Enterobactérias</b>								
<i>K. pneumoniae</i>	2	1	0	3	0	0	6	30
<i>E. coli</i>	0	1	0	0	0	0	1	5
<i>Citrobacter koseri</i>	1	0	0	0	0	0	1	5
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	1	0	0	0	1	5
<i>S. marcescens</i>	1	0	0	0	0	0	1	5
<i>K. oxytoca</i>	1	0	0	0	0	0	1	5

Nota: A linha pontilhada divide os períodos pré e pós-intervenção

Fonte: A Autora, 2015

### 13.3.1.2 Respiradores

Foram recuperados a partir dos botões dos respiradores apenas amostras de BGNNF (n=15), em sua maioria pertencentes ao gênero *Acinetobacter* (n=10; 66,67%). Uma amostra da espécie *Brevundimonas diminuta* e duas da espécie *P. aeruginosa* foram identificadas em março e abril, respectivamente (Tabela 13). Para *P. aeruginosa* e outros BGNNF não identificados houve um aumento não significativo estatisticamente do número de amostras isoladas nos períodos pré e pós-intervenção. Já a redução observada para *Acinetobacter spp.*, quando considerado o número de meses e de aparelhos testados em cada período, foi significativa (p=0,01).

Tabela 13 - Distribuição das amostras de BGNNF isoladas a partir da coleta dos respiradores do CTI Geral.

Micro-organismos	JAN	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	Total	%
<i>Acinetobacter</i> spp.	1	2	0	3	2	2	10	66,67
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	2	0	0	0	2	13,33
<i>Brevundimonas diminuta</i>	0	1	0	0	0	0	1	6,67
<b>Não identificados</b>	0	0	1	0	1	0	2	13,33

Nota: A linha pontilhada divide os períodos pré e pós-intervenção

Fonte: A Autora, 2015

### 13.3.1.3 Bombas infusoras

Os micro-organismos isolados a partir dos botões das bombas infusoras foram predominantemente BGNNF (n=11; 68,75%). Observou-se o crescimento de amostras de *Acinetobacter* spp. (n=5) e de outros BGNNF (n=6), incluindo uma amostra de *Roseomonas gilardii*, isolada em março. Dentre as cinco (31,25%) enterobactérias encontradas, duas foram identificadas como *Serratia marcescens*, ambas isoladas em janeiro, e três como Complexo *Enterobacter cloacae*, isoladas em março (Tabela 14).

Tabela 14 - Distribuição das espécies de BGN isoladas a partir da coleta das bombas infusoras no CTI Geral.

Micro-organismos	JAN	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	Total	%
<b>BGNNF</b>								
<i>Acinetobacter</i> spp.	0	0	2	1	0	2	5	31,25
<i>Roseomonas gilardii</i>	0	1	0	0	0	0	1	6,25
<b>Não identificados</b>	1	2	0	0	0	2	5	31,25
<b>Enterobactérias</b>								
<b>Complexo <i>E. cloacae</i></b>	0	3	0	0	0	0	3	18,75
<i>S. marcescens</i>	2	0	0	0	0	0	2	12,50

Nota: A linha pontilhada divide os períodos pré e pós-intervenção

Fonte: A Autora, 2015

A redução observada para BGNNF e enterobactérias entre os períodos avaliados não foi significativa em nenhum dos grupos. Entretanto valor de  $p=0,05$  para as enterobactérias sugere fortemente que haja uma significância nessa redução. Individualmente, observa-se significância na redução do isolamento de amostras do Complexo *E. cloacae* ( $p=0,01$ ) e dos BGNNF que não foram identificados em nível de espécie ( $p=0,02$ ).

#### 13.3.1.4 Pias

Nas pias o isolamento de enterobactérias ( $n=39$ ; 54,93%) e BGNNF ( $n=32$ ; 45,07%) foi equivalente. O micro-organismo mais frequente foi a *P. aeruginosa* ( $n=30$ ), representando 42,25% do total de amostras isoladas das pias em todas as coletas e 93,75% do total de BGNNF isolados neste ponto. O isolamento de *P. aeruginosa* ocorreu apenas entre janeiro e junho, não tendo sido recuperada nenhuma amostra no último mês de coleta. A segunda espécie mais isolada foi a *S. marcescens* ( $n= 10$ ; 14,08%), encontrada todos os meses nas pias do CTI Geral. Pode-se destacar também o isolamento da *K. pneumoniae*, com oito (11,27%) amostras isoladas nos primeiros quatro meses de coleta (Tabela 15).

Comparando-se os meses pré e pós-intervenção, não foi observada redução significativa para os BGNNF ou enterobactérias. Analisando-se as espécies individualmente, apenas a redução observada para *P. aeruginosa* ( $p=0,004$ ) e *S. marcescens* ( $p=0,01$ ) foi significativa.

Tabela 15 - Distribuição das espécies de BGN isoladas a partir da coleta das pias do posto de enfermagem do CTI Geral.

Micro-organismos	JAN	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	Total	%
<b>BGNF</b>								
<i>P. aeruginosa</i>	8	14	4	2	2	0	<b>30</b>	<b>42,25</b>
<i>Acinetobacter spp.</i>	1	0	0	0	0	0	<b>1</b>	<b>1,41</b>
Não identificados	1	0	0	0	1	0	<b>2</b>	<b>2,82</b>
<b>Enterobactérias</b>								
<i>S. marcescens</i>	1	2	1	2	1	3	<b>10</b>	<b>14,08</b>
<i>K. pneumoniae</i>	2	2	2	2	0	0	<b>8</b>	<b>11,27</b>
<i>K. oxytoca</i>	5	0	1	0	1	0	<b>7</b>	<b>9,86</b>
<i>Enterobacter spp.</i>	1	0	1	1	1	2	<b>6</b>	<b>8,45</b>
<i>C. freundii</i>	2	0	0	3	0	0	<b>5</b>	<b>7,04</b>
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	0	0	0	0	0	2	<b>2</b>	<b>2,82</b>
<i>Kluyvera spp.</i>	0	0	0	0	0	1	<b>1</b>	<b>1,41</b>

Nota: A linha pontilhada divide os períodos pré e pós-intervenção

Fonte: A Autora, 2015

### 13.3.2 Ar

Entre janeiro e julho foram isolados 84 BGN do ar, em todos os pontos de coleta. Os meses em que houve maior isolamento de BGN no ar foram janeiro (n=19) e abril (n=24), enquanto os meses de menor isolamento foram junho (n=10) e julho (n=2) (Tabela 16).

Tabela 16 - Distribuição das amostras de BGN isoladas a partir da coleta do ar do CTI Geral.

Ar	JAN	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	Total
<b>BGNF</b>	18	10	22	14	7	2	<b>73</b>
<b>Enterobactérias</b>	1	2	2	3	3	0	<b>11</b>
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>17</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>84</b>

Legenda: BGNF - Bacilos Gram-negativos não fermentadores

Fonte: A Autora, 2015



A maioria das amostras isoladas do ar foi BGNNF (n=73; 86,90%), das quais 16 (21,92%) foram identificadas como *P. aeruginosa*, 12 (16,44%) como *Pseudomonas* spp. e 10 (13,70%), como *Acinetobacter* spp. Foram identificadas ainda, fenotipicamente, uma amostra da espécie *Neisseria elongata* e uma da espécie *Stenotrophomonas maltophilia*. As demais amostras de BGNNF (n=30; 41,10%) não puderam ser identificadas pelo conjunto de provas utilizado.

Apenas 11 (13,10%) enterobactérias foram isoladas do ar, quatro (36,36%) pertencentes ao gênero *Enterobacter*; uma (9,09%) do gênero *Pantoea* e duas (18,18%) de cada uma das espécies: *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. marcescens* (Tabela 17).

Tabela 17 - Distribuição das espécies de BGN isoladas a partir da coleta do ar do CTI Geral.

Micro-organismos	JAN	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	Total	%
<b>BGNNF</b>								
<i>P. aeruginosa</i>	4	0	5	4	3	0	16	19,05
<i>Pseudomonas</i> spp.	0	0	6	4	1	1	12	14,29
<i>Acinetobacter</i> spp.	3	3	1	2	1	0	10	11,90
<i>P. stutzeri</i>	0	0	1	1	0	0	2	2,38
<i>P. luteola</i>	0	1	0	0	0	0	1	1,19
<i>Neisseria elongata</i>	1	0	0	0	0	0	1	1,19
<i>S. maltophilia</i>	0	0	0	0	1	0	1	1,19
Não identificados	10	6	9	3	1	1	30	35,71
<b>Enterobactérias</b>								
Complexo <i>E. cloacae</i>	1	1	0	0	0	0	2	2,38
<i>E. coli</i>	0	0	1	1	0	0	2	2,38
<i>K. pneumoniae</i>	0	1	0	0	1	0	2	2,38
<i>S. marcescens</i>	0	0	0	2	0	0	2	2,38
<i>P. agglomerans</i>	0	0	0	0	1	0	1	1,19
<i>Pantoea</i> spp.	0	0	0	0	1	0	1	1,19
<i>Enterobacter</i> spp.	0	0	1	0	0	0	1	1,19

Legenda: BGNNF- espécies não identificadas de nãofermentadores.

Nota: Percentual calculado sobre número total de micro-organismos isolados no ar.

Fonte: A Autora, 2015

Poucos BGN foram isolados a partir do ar coletado nas regiões do CTI mais distantes dos pacientes. Na saída do expurgo, quatro *P. aeruginosa*, uma *P. stutzeri*, uma *Pseudomonas* spp., três BGNNF e uma amostra do CEC foram identificados, enquanto para a sala de reuniões, foram isoladas duas amostras de BGNNF não identificados, uma de *Neisseria elongata*, uma de *E. coli* e uma de *Acinetobacter* spp. Já para o posto de enfermagem, o ar coletado apresentou colônias de *A. baumannii* (n=2), *P. aeruginosa* (n=3), *Pseudomonas* spp. (n=3) e BGNNF (n=2).

#### 13.4 Enterobactérias

Um total de 63 amostras de enterobactérias foi identificado em nível de espécie e três apenas em gênero. A espécie mais encontrada foi *K. pneumoniae* (n=16; 24,24%), seguida por *S. marcescens* (n=15; 22,73%) e CEC (n=10; 15,15%) (Tabela 7). Também foram isoladas espécies ambientais, que raramente estão associadas a infecções em humanos: *Raoutella ornithinolytica* (n=2), *Kluyvera* spp. (n=1) e *Pantoea* spp. (n=1).

Observou-se o isolamento de enterobactérias em todos os meses estudados, sendo janeiro o mês de maior ocorrência, seguido, respectivamente, por maio e março. As espécies *K. pneumoniae* e *S. marcescens* foram encontradas em todos os meses de coleta, já o CEC não foi observada no mês de junho (Tabela 18).

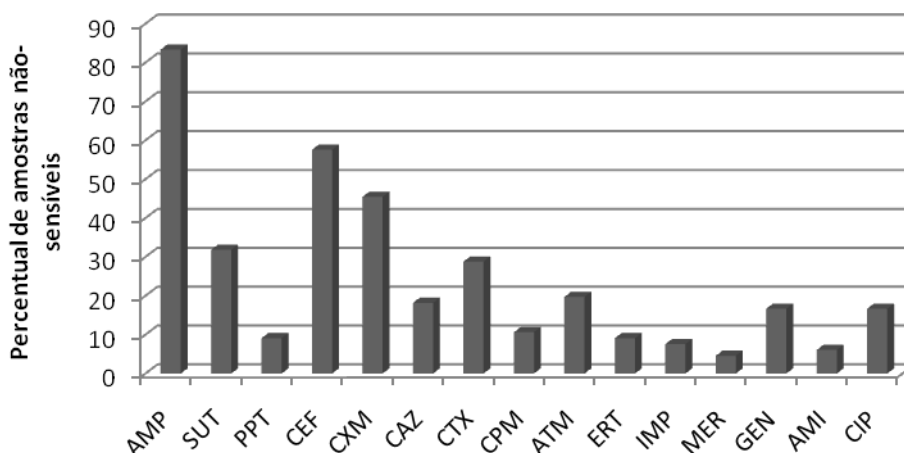
Tabela 18 - Distribuição das espécies de enterobactérias isoladas do ambiente do CTI Geral.

<b>Enterobactérias</b>	<b>JAN</b>	<b>MAR</b>	<b>ABR</b>	<b>MAI</b>	<b>JUN</b>	<b>JUL</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	4	2	5	1	0
<i>Serratia marcescens</i>	4	2	1	4	1	3
<b>Complexo <i>E. cloacae</i></b>	2	4	1	1	0	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	0	1	0	1	0
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0	0	3	0	0
<i>Citrobacter koseri</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	1	1	1	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	0	0	0	0	2	0
<i>Enterobacter spp.</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Kluyveraspp.</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Raoutella ornithinolytica</i>	0	0	0	0	0	2
<i>Pantoea sp.</i>	0	0	0	0	1	0
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>8</b>

Fonte: A Autora, 2015

De maneira geral, as enterobactérias isoladas do ambiente mostraram-se sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados para o grupo. As maiores taxas de resistência intermediária ou plena observadas foram: 83,33% para ampicilina, 57,58% para cefalotina e 45,45% para cefuroxima. A alta taxa de resistência a ampicilina, no entanto, deve-se em parte à resistência intrínseca da espécie *K. pneumoniae*. A resistência aos carbapenêmicos e amicacina foi inferior a 10%, para gentamicina e ciprofloxacina a taxa foi de 16,67% (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Percentual de amostras de enterobactérias com resistência intermediária ou plena aos antimicrobianos testados.



Legenda: AMP- ampicilina; SUT- sulfametoxazol com trimetoprim; PPT- piperacilina com tazobactam; CEF- cefalotina; CXM- cefuroxima; CAZ- ceftazidima; CTX- cefotaxima; CPM- cefepime; ATM- aztreonam; ERT- ertapenem; IMP- imipenem; MER- meropenem; GEN- gentamicina; AMI- amicacina; CIP- ciprofloxacina.

Fonte: A Autora, 2015

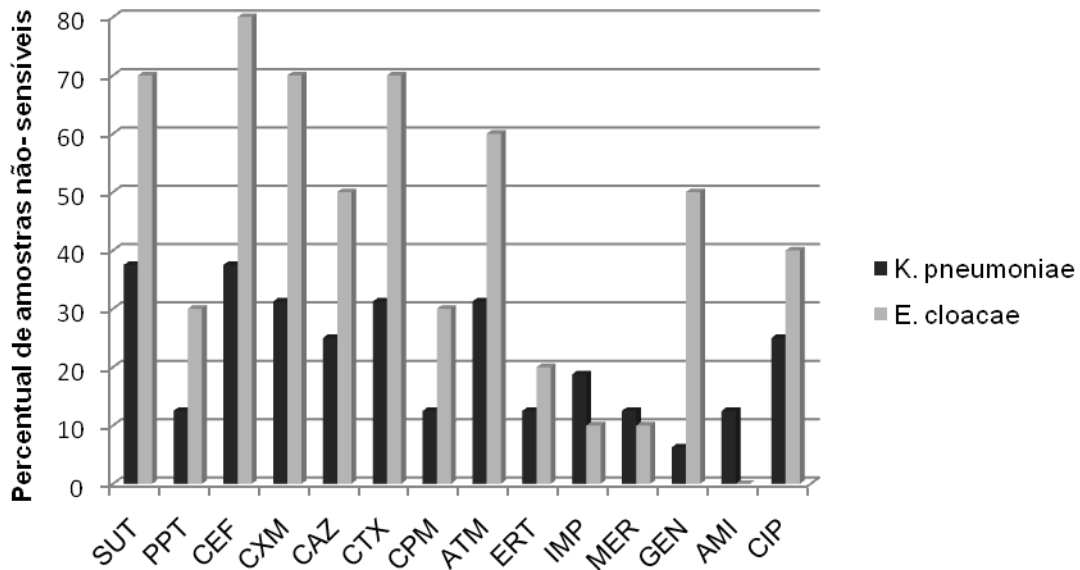
Apenas 19 (28,79%) amostras de cinco espécies foram positivas para o teste fenotípico de detecção de ESBL: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, Complexo *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *S. marcescens*. Dentre essas, três *K. pneumoniae*, três CEC e uma *K. oxytoca*, totalizando sete amostras (10,61%), apresentaram diferença de halo  $\geq 5$ mm para os discos de carbapenêmicos puros e adicionados de ácido fenilborônico, sugerindo a produção de carbapenemases de classe A, como a enzima KPC.

A espécie *K. pneumoniae* (n=16) e o CEC (n=10) apresentaram as mais altas taxas de resistência (intermediária ou plena). Para *K. pneumoniae*, o maior percentual de resistência foi 37,5% para SUT e CEF, seguido de 31,25% para CXM, CTX e ATM. A resistência aos carbapenêmicos foi de 12,5% para ERT e MER, e 18,75% para IMI (Gráfico 2).

O Complexo *E. cloacae* mostrou maiores taxas de resistência para a maioria dos antimicrobianos, com taxas de 80% para CEF e 70% para SUT, CXM e CTX. Para os carbapenêmicos, o percentual de resistência foi baixo: 20% de resistência a

ERT e 10% para IMI e MER. Todas as amostras da espécie foram susceptíveis a AMI (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Percentual de amostras de *K. pneumoniae* e Complexo *E. cloacae* com resistência intermediária ou plena aos antimicrobianos testados.



Legenda: SUT- sulfametoxazol com trimetoprim; PPT- piperacilina com tazobactam; CEF- cefalotina; CXM- cefuroxima; CAZ- ceftazidima; CTX- cefotaxima; CPM- cefepime; ATM- aztreonam; ERT- ertapenem; IMP- imipenem; MER- meropenem; GEN- gentamicina; AMI- ampicilina; CIP- ciprofloxacina.

Fonte: A Autora, 2015

A resistência também foi maior no CEC para o carbapenêmico ertapenem, que não é considerado um bom indicador da resistência a essa classe de antimicrobianos no chamado grupo CESP, da qual essa espécie faz parte. Das três amostras produtoras de KPC, uma apresentou resistência intermediária somente ao ertapenem, sendo sensível ao imipenem e ao meropenem. Outra amostra foi intermediária para imipenem e meropenem e resistente apenas para o ertapenem. Para a terceira amostra, os halos para os carbapenêmicos seriam classificados como sensíveis pelos critérios adotados. Uma vez que o halo para ertapenem encontrava-se bem próximo ao valor classificado como intermediário, essa amostra foi incluída no teste fenotípico de triagem para a produção de carbapenemases, que

apontou a produção da enzima KPC. Esse perfil foi confirmado pelo teste molecular de PCR.

Na Tabela 19 estão representados os perfis de resistência das enterobactérias isoladas no estudo. Uma amostra de *K. pneumoniae* foi resistente a 14 dos 15 antimicrobianos testados (excluindo-se a ampicilina, a que essa espécie possui resistência intrínseca). Apesar do perfil de multirresistência observado para algumas amostras, a maioria (n=10) das amostras de *K. pneumoniae* foi sensível a todos os antimicrobianos.

Apenas uma amostra de *S. marcescens* mostrou perfil de multirresistência. O CEC apresentou maior percentual (60%) de amostras MDR. Duas amostras de *C. freundii* e uma de *K. oxytoca* multirresistentes foram isoladas. A amostra de *P. mirabilis* também foi considerada multirresistente pelos critérios adotados.

As amostras de *P. agglomerans*, *Enterobacter* spp. e *Pantoea* spp. foram resistentes a apenas um antimicrobiano. Já para *R. ornithinolytica*, uma amostra foi totalmente sensível e a outra, resistente apenas a ampicilina. *E. coli* e *Kluyvera* spp. foram sensíveis a todos os antimicrobianos avaliados.

Os testes moleculares demonstraram que, dentre as 19 amostras positivas para o teste fenotípico de ESBL, sete apresentaram produto de amplificação apenas para o gene *bla*<sub>TEM</sub>, três apenas para o *bla*<sub>CTX</sub> e nove para ambos os genes de ESBL testados (Tabela 20).

A PCR para carbapenemases confirmou a presença do gene *bla*<sub>KPC</sub> nas sete amostras sugestivas da produção dessa enzima pelo teste fenotípico. Todas as amostras produtoras de KPC também produziam enzimas ESBL: duas amostras amplificaram o gene *bla*<sub>TEM</sub>, outras duas amplificaram o *bla*<sub>CTX</sub> e as demais (n=3) apresentaram os dois genes de ESBL pesquisados (Tabela 20).

Analisando-se as amostras isoladas do ar, observamos que uma amostra do CEC produtora de TEM e CTX foi isolada da saída do expurgo no mês de março. Nesse mesmo mês, uma *K. pneumoniae* produtora de TEM foi encontrada no ar do leito sete. No mês de junho, uma amostra de *K. pneumoniae* produtora de TEM, CTX e KPC foi isolada a partir do ar coletado no leito seis.

Tabela 19 - Perfis de resistência de amostras de enterobactérias, isoladas a partir do ar e de superfícies. (Continua)

<b>Espécie</b>	<b>Perfil de resistência</b>	<b>Nº de amostras</b>
<b><i>K. pneumoniae</i></b> <b>(n=16)</b>	AMC, SUT, PPT, CEF, CXM, CAZ, CTX, CPM, ATM, ERT, IMP, MER, GEN, CIP	1
	AMC, SUT, PPT, CEF, CXM, CAZ, CTX, ATM, ERT	1
	AMC, SUT, CEF, CAZ, CTX, ATM	1
	AMC, SUT, CEF, CTX, ATM	1
	AMC, SUT, CEF, ATM, AMI	1
	AMC, SUT, CEF	1
	-	10
<b><i>S. marcescens</i></b> <b>(n=15)</b>	SUT, CEF, CTX, GEN, AMI	2
	CEF	13
<b>Complexo</b> <b><i>E. cloacae</i></b> <b>(n=10)</b>	SUT, CEF, CXM, CAZ, CTX, CPM, ATM, GEN, CIP	1
	SUT, CEF, CXM, CAZ, CTX, CPM, ATM, ERT	1
	SUT, CEF, CXM, CAZ, CTX, ATM, GEN, CIP	2
	SUT, CEF, CXM, CTX, ATM, GEN, CIP	1
	SUT, CEF, CXM, CTX	1
	SUT, CEF	1
	CEF, CXM	1
-	2	
<b><i>K. oxytoca</i></b> <b>(n=8)</b>	AMC, SUT, PPT, CEF, CXM, CTX, ATM	1
	AMC, SUT, CEF	1
	-	6
<b><i>C. freundii</i></b> <b>(n=5)</b>	SUT, CEF, CXM, CTX, GEN, CIP	2
	CEF	1
	-	2
<b><i>P. agglomerans</i></b> <b>(n=2)</b>	AMP	2
<b><i>Enterobacter spp.</i></b> <b>(n=1)</b>	CEF	1

Tabela 19 - Perfis de resistência de amostras enterobactérias, isoladas a partir do ar e de superfícies. (Conclusão)

Espécie	Perfil de resistência	Nº de amostras
<i>C. koseri</i> (n=1)	SUT, CEF, CXM, CTX	1
<i>Pantoea</i> sp. (n=1)	AMP	1
<i>P. mirabilis</i> (n=1)	AMP, SUT, CIP	1
<i>R. ornithinolytica</i> (n=2)	AMP -	1 1

Legenda: SUT- sulfametoxazol com trimetoprim; PPT- piperacilina com tazobactam; CEF- cefalotina; CXM- cefuroxima; CAZ- ceftazidima; CTX- cefotaxima; CPM- cefepime; ATM- aztreonam; ERT- ertapenem; IMP- imipenem; MER- meropenem; GEN- gentamicina; AMI- ampicilina; CIP- ciprofloxacina.

Fonte: A Autora, 2015

Para as bombas infusoras, foi observado o isolamento de três amostras do CEC produtoras de TEM e CTX no mês de março. Duas originaram-se de um mesmo ponto de coleta, o leito três e a terceira, do leito quatro.

Apenas em janeiro houve isolamento de enterobactérias a partir dos carrinhos de enfermagem, com a identificação de *C. koseri* produtor de CTX e *K. pneumoniae* produtora de CTX e KPC no leito sete.

A maioria (n=11) das enterobactérias MDR foi isolada das pias do posto de enfermagem. Em janeiro foram encontradas três espécies distintas carreando o gene *bla*<sub>KPC</sub>: *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* e CEC. Na coleta de março, apenas uma amostra de *K. pneumoniae* produtora de TEM foi identificada. Para o mês de abril, Complexo *E. cloacae* produtor de KPC e *K. pneumoniae* produtora de TEM foram detectadas. Uma amostra do CEC produtora de KPC foi encontrada em maio, bem como uma amostra de *C. freundii* produtora de TEM e CTX. Não houve isolamento de enterobactéria MDR em junho e em julho apenas duas amostras de *S. marcescens* produtoras de TEM foram observadas.



Tabela 20 - Perfil fenotípico e molecular de enterobactérias MDR isoladas a partir dos diversos pontos de coleta.

Local	Ponto	Mês	Micro-organismo	Testes fenotípicos	Testes moleculares		
					TEM	CTX	KPC
Ar (n=3)	10	MAR	CEC	ESBL	+	+	-
	7	MAR	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	+	-	-
	6	JUN	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL, KPC	+	+	+
Bomba (n=3)	3	MAR	CEC	ESBL	+	+	-
	3	MAR	CEC	ESBL	+	+	-
	4	MAR	CEC	ESBL	+	+	-
Carro (n=2)	7	JAN	<i>Citrobacter koseri</i>	ESBL	-	+	-
	7	JAN	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL, KPC	-	+	+
Pia (n=11)	8	JAN	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ESBL, KPC	-	+	+
	8	JAN	<i>Citrobacter freundii</i>	ESBL	+	+	-
	8	JAN	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL, KPC	+	+	+
	8	JAN	CEC	ESBL, KPC	+	-	+
	8	MAR	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	+	-	-
	8	ABR	CEC	ESBL, KPC	+	+	+
	8	ABR	<i>K. pneumoniae</i>	ESBL	+	-	-
	8	MAI	<i>Citrobacter freundii</i>	ESBL	+	+	-
	8	MAI	CEC	ESBL, KPC	+	-	+
	8	JUL	<i>S. marcescens</i>	ESBL	+	-	-
	8	JUL	<i>S. marcescens</i>	ESBL	+	-	-

Fonte: A Autora, 2015

### 13.5 *Pseudomonas* spp.

Um total de 68 amostras do gênero *Pseudomonas* foi isolado, a maioria (n=51; 75%) identificada como *P. aeruginosa*. Os sítios de coleta em que houve maior isolamento da espécie foram pias (n=30; 58,82%) e ar (n=16; 31,37%) (Tabela 21). Nenhuma amostra de *P. aeruginosa* foi recuperada a partir das bombas infusoras.

Duas amostras de *P. stutzeri* e uma de *P. luteola* foram isoladas a partir das coletas de ar. Dentre as amostras identificadas apenas como *Pseudomonas* spp. (n=14), a maioria foi isolada do ar (n=12; 85,71%) e apenas duas (14,29%), dos carrinhos de enfermagem.

Cerca de metade (56,86%) das amostras de *P. aeruginosa* foi isolada apenas nos meses pré-intervenção (janeiro e março) (Tabela 22). O número de amostras recuperadas diminuiu a cada coleta, até que não houve isolamento em julho. Já as amostras de *Pseudomonas* spp. foram isoladas apenas no período pós-intervenção. Houve isolamento em todos os meses pós-intervenção, com maior ocorrência no mês de abril.

Tabela 21 - Distribuição das espécies do gênero *Pseudomonas* isoladas a partir da coleta do ambiente do CTI Geral nos diversos sítios de coleta.

<b>Espécie (n)</b>	<b>Sítio de coleta</b>	<b>Nº de amostras</b>	<b>Percentual (%)</b>
<b><i>P. aeruginosa</i> (n=51)</b>	Ar	16	23,53
	Carrinho de enfermagem	3	4,41
	Respiradores	2	2,94
	Pias	30	44,12
<b><i>Pseudomonas</i> spp. (n=14)</b>	Ar	12	17,65
	Carrinho de enfermagem	2	2,94
<b><i>P. stutzeri</i> (n=2)</b>	Ar	2	2,94
<b><i>P. luteola</i> (n=1)</b>	Ar	1	1,47

Fonte: A Autora, 2015

Tabela 22 - Distribuição das espécies do gênero *Pseudomonas* isoladas a partir da coleta do ambiente do CTI Geral ao longo dos meses.

<b>Espécies</b>	<b>JAN</b>	<b>MAR</b>	<b>ABR</b>	<b>MAI</b>	<b>JUN</b>	<b>JUL</b>
<i>P. aeruginosa</i>	13	16	11	6	5	0
<i>Pseudomonas spp</i>	0	0	8	4	1	1
<i>P. stutzeri</i>	0	0	1	1	0	0
<i>P. luteola</i>	0	1	0	0	0	0

Fonte: A Autora, 2015

Independentemente do ponto de coleta, a maioria das amostras de *P. aeruginosa* foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Apenas duas amostras isoladas de superfícies apresentaram perfil de multirresistência, ambas isoladas das pias. Uma amostra de pia foi resistente a gentamicina e ciprofloxacina e duas amostras foram resistentes apenas ao imipenem (Tabela 23).

Tabela 23 - Perfis de resistência de amostras de *P. aeruginosa* isoladas a partir do ar ou de superfícies.

<b>Local de coleta</b>	<b>Perfil de resistência</b>	<b>Nº de amostras</b>
<b>Ar</b>	ATM	1
	-	15
<b>Superfícies</b>	CAZ, CPM, ATM, IMP, MER, CIP	1
	CAZ, CPM, IMP, GEN	1
	GEN, CIP	1
	IMP	2
	ATM	1
	-	29

Legenda: ATM- aztreonam; CAZ- ceftazidima; CPM- cefepime; IMP- imipenem; MER- meropenem; GEN- gentamicina; CIP- ciprofloxacina.

Fonte: A Autora, 2015

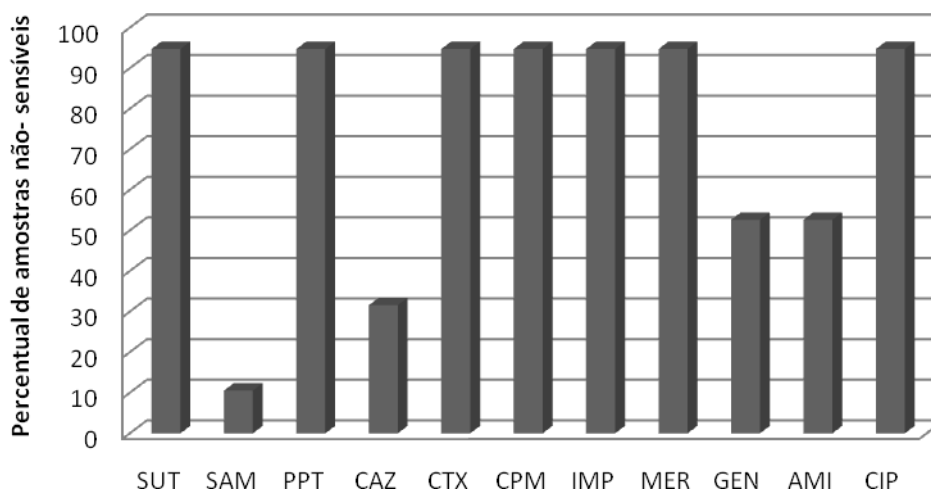
### 13.6 *Acinetobacter* spp.

Nos seis meses e em diversos pontos de coleta, foram isoladas 29 amostras do gênero *Acinetobacter*, das quais dez foram recuperadas das coletas de ar e 19, das superfícies. Pela amplificação do gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, 19 amostras foram identificadas como *A. baumannii* e as demais, que não carregavam o gene, foram classificadas como *Acinetobacter* não-*baumannii* (Anb).

Sete das dez cepas (70%) identificadas como Anb foram obtidas a partir da coleta de ar. Dentre as 19 amostras isoladas na coleta das superfícies analisadas, apenas três (15,79%) foram Anb, predominando, portanto, o *A. baumannii* nesses sítios de coleta.

Todas as amostras de *A. baumannii* encontradas apresentaram perfil de multirresistência e amplificaram, além do *bla*<sub>OXA-51</sub>, o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> que possui uma conhecida atividade de carbapenemase. O percentual de amostras não- sensíveis (resistência intermediária ou plena) foi de 94,44% para sete dos antimicrobianos testados: SUT, PPT, CTX, CPM, IMI, MER e CIP (Gráfico 3). Cerca de metade das amostras foi sensível aos aminoglicosídeos (GEN e AMI) e os maiores percentuais de sensibilidade foram observados para SAM (10,53%; n=2) e CAZ (31,58%; n=6). As amostras de Anb, por sua vez, foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados.

Gráfico 3 - Percentual de amostras de *A. baumannii* isoladas de ar e superfícies com resistência intermediária ou plena aos antimicrobianos.



Legenda: SUT- sulfametoxazol com trimetoprim; SAM- ampicilina com sulbactam; PPT- piperacilina com tazobactam; CAZ- ceftazidima; CTX- cefotaxima; CPM- cefepime; IMP- imipenem; MER- meropenem; GEN- gentamicina; AMI- amicacina; CIP- ciprofloxacina.

Fonte: A Autora, 2015

Entre as 10 amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas do ar foram observados seis perfis de resistência (Tabela 24), sendo mais frequente amostras de Anb sensíveis a todos os antimicrobianos (n=5). Cada uma das três amostras de *A. baumannii* identificadas apresentou um perfil de resistência diferente, variando entre eles apenas em relação aos aminoglicosídeos.

Já para as 19 amostras de superfícies, dez perfis de resistência foram identificados, dois em Anb e os demais em amostras de *A. baumannii* (Tabela 24). Destes, o mais comumente observado (n=4) apresentou sensibilidade apenas para cefalosporinas (CTX e CAZ) e SAM. Duas amostras de *A. baumannii* foram sensíveis apenas a SAM.

Tabela 24 - Perfis de resistência de amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas a partir do ar ou de superfícies.

Local de coleta	Perfil de resistência	Nº de amostras	Espécie
<b>Ar</b> <b>(n=10)</b>	SUT, PPT, CPM, IMP, MER, GEN, AMI, CIP	1	Ab
	SUT, PPT, CPM, IMP, MER, GEN, CIP	1	Ab
	SUT, PPT, CPM, IMP, MER, AMI, CIP	1	Ab
	SUT	1	Anb
	CAZ	1	Anb
	-	5	Anb
<b>Superfícies</b> <b>(n=19)</b>	SUT, PPT, CAZ, CTX, CPM, IMP, MER, GEN, AMI, CIP	2	Ab
	SUT, PPT, CAZ, CTX, CPM, IMP, MER, AMI, CIP	2	Ab
	SUT, PPT, CAZ, CTX, CPM, IMP, MER, CIP	1	Ab
	SUT, PPT, CPM, IMP, MER, GEN, AMI, CIP	4	Ab
	SUT, SAM, PPT, CAZ, CTX, IMP, MER, CIP	1	Ab
	SUT, PPT, CPM, IMP, MER, GEN, CIP	2	Ab
	SUT, PPT, CPM, IMP, MER, CIP	3	Ab
	SUT, PPT, CPM, MER, CIP	1	Ab
	SUT, CAZ	1	Anb
	-	2	Anb

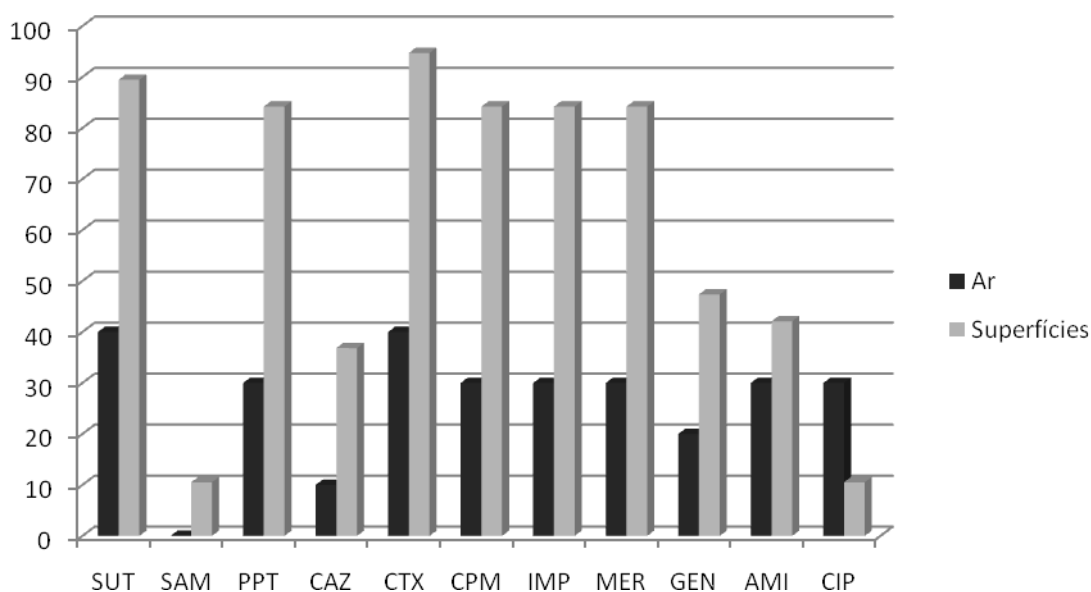
Legenda: SUT- sulfametoxazol com trimetoprim; SAM- ampicilina com sulbactam; PPT- piperacilina com tazobactam; CAZ- ceftazidima; CTX- cefotaxima; CPM- cefepime; IMP- imipenem; MER- meropenem; GEN- gentamicina; AMI- amicacina; CIP- ciprofloxacina.

Fonte: A Autora, 2015

Os genes *bla*<sub>OXA-24</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub> não foram encontrados neste estudo.

De maneira geral, as amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas de superfícies apresentaram maiores percentuais de resistência a antimicrobianos em relação às amostras isoladas de ar (Gráfico 4). Enquanto o maior percentual de resistência para as amostras de ar foi <40%, as amostras de superfícies mostraram valores próximos a 95%. Para a ciprofloxacina, no entanto, as amostras de ar apresentaram maiores percentuais de resistência.

Gráfico 4 - Percentual de amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas de ar ou das superfícies com resistência intermediária ou plena aos antimicrobianos.



Legenda: SUT- sulfametoxazol com trimetoprim; SAM- ampicilina com sulbactam; PPT- piperacilina com tazobactam; CAZ- ceftazidima; CTX- cefotaxima; CPM- cefepime; IMP- imipenem; MER- meropenem; GEN- gentamicina; AMI- amicacina; CIP- ciprofloxacina.

Fonte: A Autora, 2015

Uma amostra de *Acinetobacter* não-*baumannii*, denominada 5-2Ac02 e isolada no mês de maio a partir do ar coletado no leito 2, apresentou produto de amplificação para o gene *bla*<sub>OXA-58</sub>, apesar de ser sensível aos 11 antimicrobianos testados. A presença desse gene foi confirmada por sequenciamento. O sequenciamento do gene *rpoB* não foi capaz de identificar uma espécie descrita de *Acinetobacter*. A sequência encontrada mostrou apenas 95% de identidade com a sequência com número de acesso no *Genbank* GU245962, depositada por Turton e colaboradores, em 2010, em que os autores sugerem que essa sequência representa uma nova espécie de *Acinetobacter*.

Devido ao seu potencial como reservatório de genes de carbapenemases, à sua singularidade como uma cepa isolada a partir do ar e a fim de identificar a espécie para ampliar os conhecimentos sobre espécies de Anb, a cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 foi selecionada para o sequenciamento massivo do genoma.

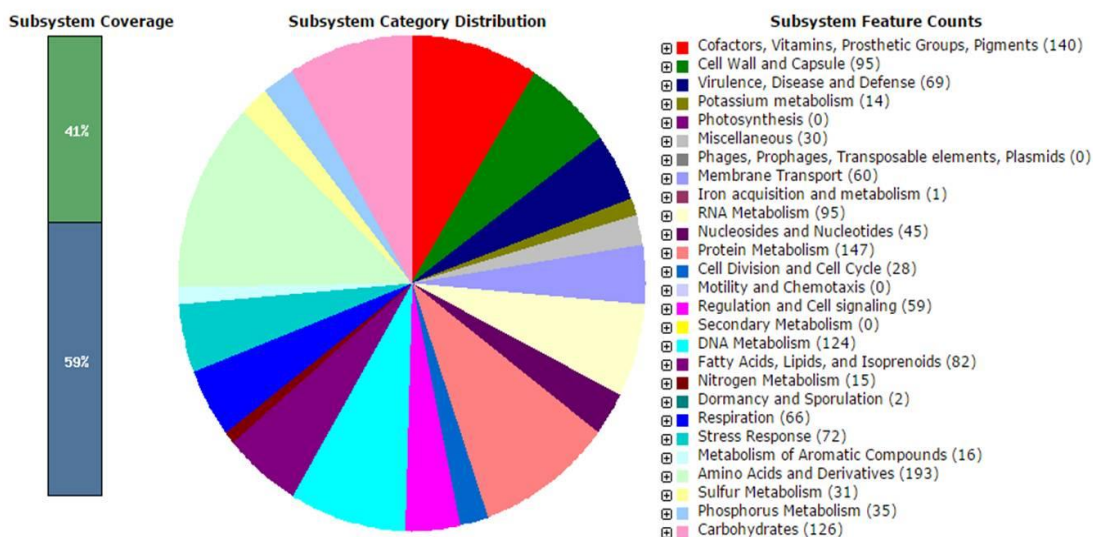
### 13.6.1 Sequenciamento do genoma completo de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02

O tamanho estimado do genoma sequenciado foi de 2.740.796pb, com uma cobertura de 130 vezes e um conteúdo GC de aproximadamente 41%. O Apêndice A representa as principais características do genoma de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 e de outros genomas de *Acinetobacter* spp. disponíveis no *Genbank*. O total de *contigs* foi de 833, o maior deles com 31.190pb e o menor, com 525pb. O bioservidor RAST identificou 2.615 sequências codificadoras de proteínas, das quais 1.067 (41%) estavam distribuídas em 326 subsistemas (Figura 5), e 43 sequências de RNA. Os subsistemas encontrados pelo RAST estão descritos com mais detalhes no Apêndice B.

Cerca de 180 ( $\approx 6,8\%$ ) genes anotados pelo RAST foram alinhados, através do BLAST de nucleotídeos, com sequências pertencentes ao projeto de sequenciamento do genoma de uma espécie de inseto da família dos coleópteros, *Dendroctonus ponderosae*, considerado uma praga de pinheiros na América do norte (Keeling *et al.*, 2013). Segundo os autores, é provável que tenha ocorrido uma contaminação com o genoma de *Acinetobacter* sp. presente no sistema digestivo do animal durante o processo de extração de DNA dos insetos (Keeling *et al.*, 2013).



Figura 5 - Lista e representação gráfica dos subsistemas caracterizados pelo RAST, número de proteínas anotadas e percentual de proteínas classificadas em subsistemas.

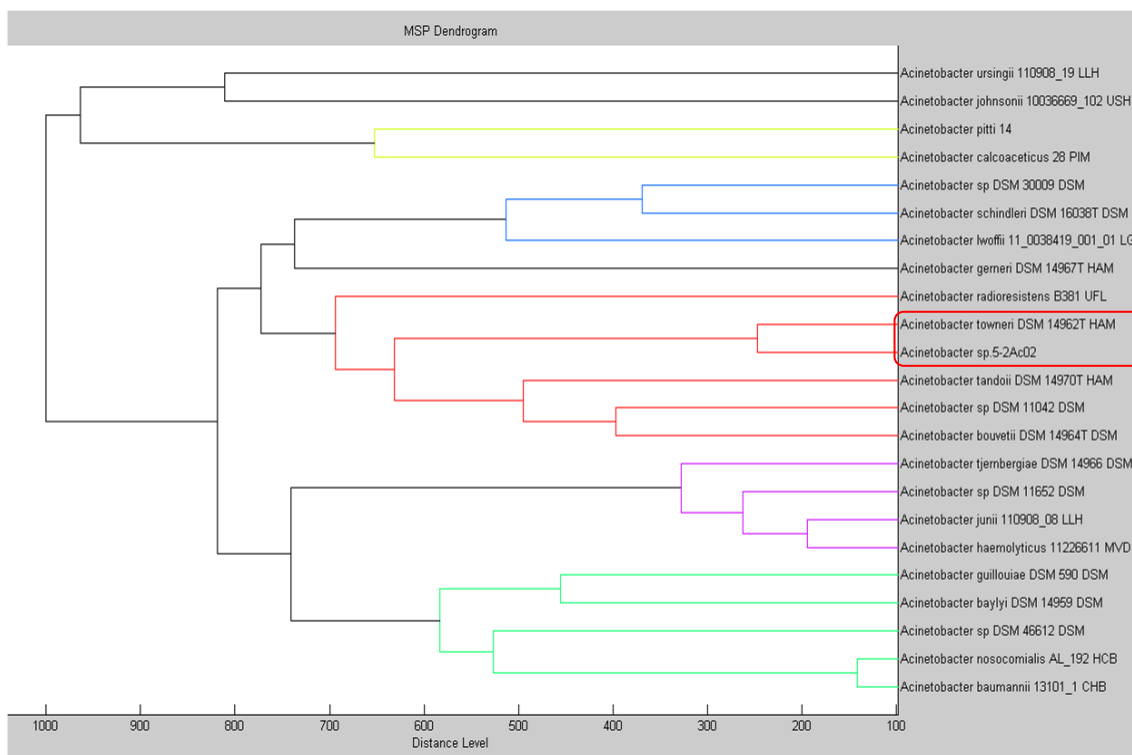


Fonte: <http://www.theseed.org>

### 13.6.1.1 Identificação de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02

O espectro obtido pela técnica de MALDI-TOF MS para a cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 apresentou um *score* de 2.127 de identificação com a espécie *A. towneri*, o que, segundo os critérios de interpretação do fabricante, significa que a identificação do gênero é segura, porém a espécie é apenas provável. O dendrograma gerado a partir da comparação entre o espectro da cepa estudada e os espectros das demais espécies do gênero *Acinetobacter* disponíveis no banco de dados do equipamento revelou que a cepa em estudo pertence ao mesmo *cluster* da espécie *A. towneri* (Figura 6) e distante das demais espécies.

Figura 6 - Dendrograma dos espectros gerados pelo MALDI-TOF MS para cepas de diversas espécies do gênero *Acinetobacter*



Fonte: A Autora, 2015

A comparação da identidade média de nucleotídeos também mostrou que a espécie *A. towneri* é a mais próxima da cepa estudada, entretanto a identidade entre elas não alcança o ponto de corte de 95-96% proposto para classificar genomas dentro de uma mesma espécie (Richter e Rosselló-Móra, 2009) (Tabela 25). Embora haja uma diferença de 9,59% nos valores de identidade apontados pelas plataformas utilizadas, ambas mostram a maior identidade para *A. towneri*, com apenas 0,96% de diferença entre os valores obtidos.

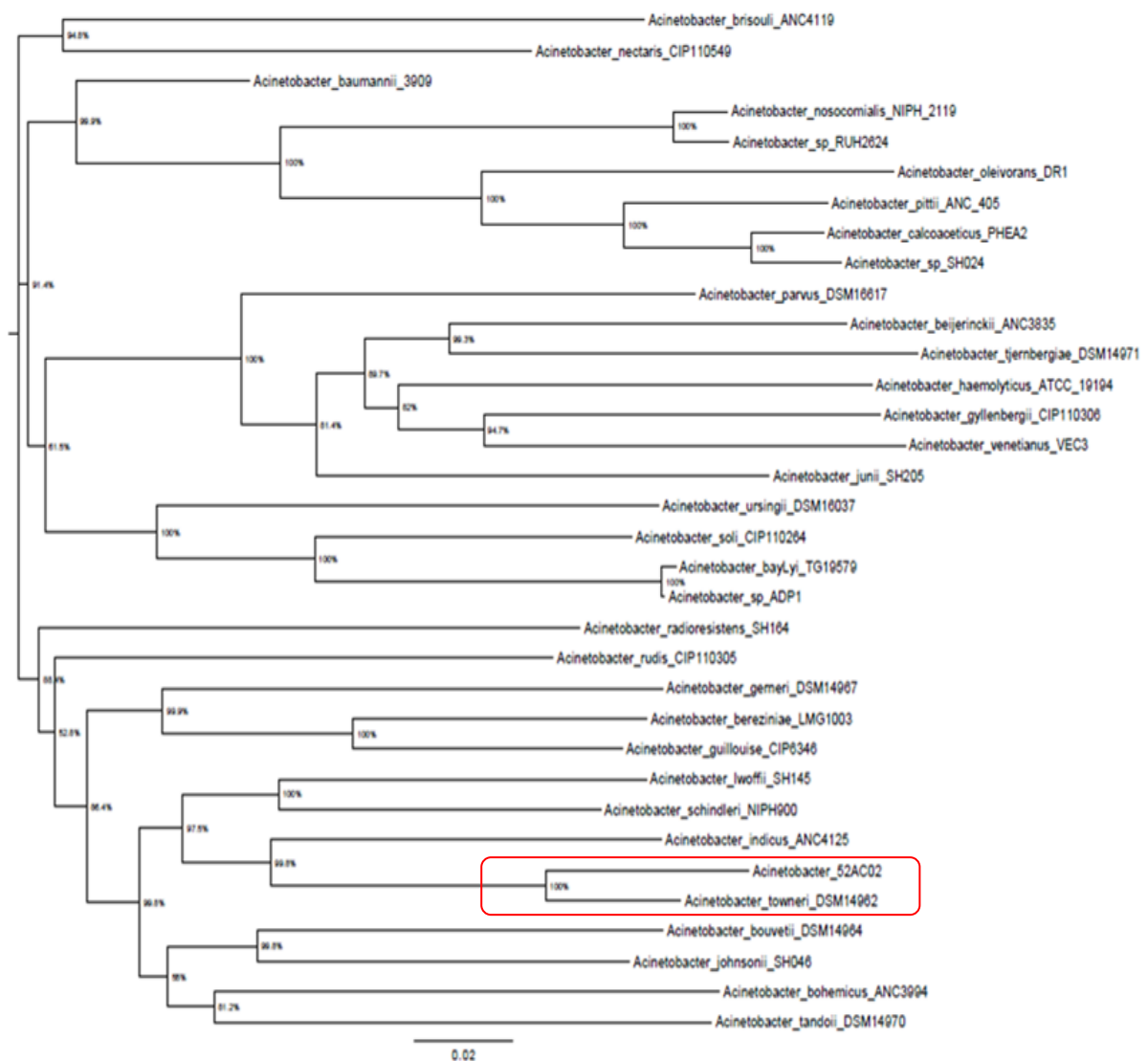
O dendrograma construído a partir da matriz gerada pela comparação de SNPs posicionou o genoma do *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 próximo à cepa *A. towneri* DSM14962 (Figura 7). Embora bastante semelhantes, as cepas citadas acima não apresentam a mesma distância observada para cepas da mesma espécie.

Tabela 25 - Resultados da comparação da identidade média de nucleotídeos (ANI) entre genomas

Genoma	ANI (%)		Nº de acesso
	EZGenome	Kostas lab	
<i>A. baumannii</i> 3909	75.13	83.12	GCA_000189695.2
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	75.03	83.11	GCA_000162295.1
<i>A. baylyi</i> ADP1	74.35	81.86	GCA_000046845.1
<i>A. baylyi</i> TG19579	74.34	81.74	GCA_000302115.1
<i>A. beijerinckii</i> ANC 3835	74.76	82.18	GCA_000368985.1
<i>A. bereziniae</i> LMG 1003	76.09	83.37	GCA_000248295.2
<i>A. bohemicus</i> ANC 3994	77.21	82.98	GCA_000367925.1
<i>A. bouvetii</i> DSM 14964	76.13	82.94	GCA_000373725.1
<i>A. brisouii</i> ANC 4119	74.60	82.93	GCA_000368645.1
<i>A. calcoaceticus</i> PHEA-2	74.79	82.79	CP002177.1
<i>A. gerneri</i> DSM 14967	75.71	83.60	GCA_000368565.1
<i>A. guillouiae</i> CIP 63.46	76.11	83.68	GCA_000368145.1
<i>A. gyllenbergii</i> CIP 110306	75.02	82.41	GCA_000413855.1
<i>A. haemolyticus</i> ATCC 19194	75.05	82.85	GCA_000164055.1
<i>A. indicus</i> ANC 4125	78.37	84.43	GCA_000413875.1
<i>A. johnsonii</i> SH046	77.49	84.10	GCA_000162055.1
<i>A. junii</i> SH205	75.55	84.38	GCA_000162075.1
<i>A. lwoffii</i> SH145	77.36	83.97	GCA_000162095.1
<i>A. nectaris</i> CIP110549	72.45	81.58	GCA_000488215.1
<i>A. nosocomialis</i> NIPH 2119	74.86	82.40	GCA_000368085.1
<i>A. nosocomialis</i> RUH 2624	75.10	82.85	GCA_000162375.2
<i>A. oleivorans</i> DR1	74.72	82.60	GCA_000196795.1
<i>A. parvus</i> DSM 16617	75.71	83.92	GCA_000248155.2
<i>A. pittii</i> ANC 4050	74.69	82.78	GCA_000399685.1
<i>A. pittii</i> SH024	75.00	83.08	GCA_000163635.1
<i>A. radioresistens</i> SH164	74.27	83.86	GCA_000162115.1
<i>A. rudis</i> CIP 110305	74.05	82.39	GCA_000413895.1
<i>A. schindleri</i> NIPH 900	77.20	84.82	GCA_000368465.1
<i>A. soli</i> CIP 110264	74.01	82.21	GCA_000368705.1
<i>A. tandoii</i> DSM 14970	77.23	84.33	GCA_000400735.1
<i>A. tjernbergiae</i> DSM 14971	75.00	82.44	GCA_000374425.1
<i>A. townneri</i> DSM 14962	93.43	94.39	GCA_000368785.1
<i>A. ursingii</i> DSM 16037	75.53	83.12	GCA_000248135.2
<i>A. venetianus</i> VE-C3	75.24	83.50	GCA_000308235.2

Fonte: A Autora, 2015

Figura 7 - Dendrograma representativo da relação filogenética entre espécies de *Acinetobacter*, baseado na comparação de SNPs entre genomas.



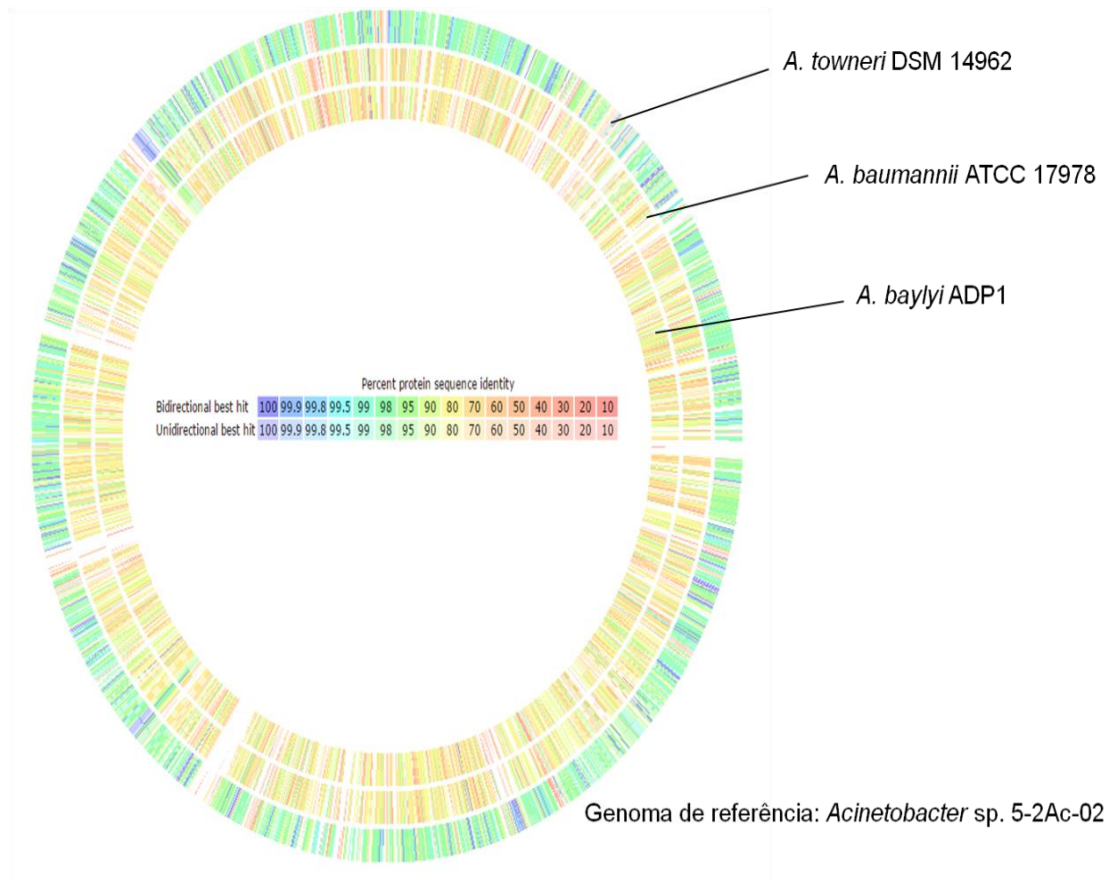
Fonte: A Autora, 2015

A partir das informações obtidas pelas técnicas de ANI e de filogenia baseada em SNPs, realizou-se a comparação de genomas disponível no bioservidor RAST para os genomas anotados nessa plataforma. Foram selecionados os genomas de *A. towneri* DSM 14962, *A. baumannii* ATCC 17978 e *A. baylyi* ADP1 (Figura 8). Utilizou-se como referência o genoma de interesse, de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02. De acordo com os valores de similaridade atribuídos a cada cor, podemos confirmar a semelhança entre o genoma de uma cepa da espécie *A. towneri* com o genoma em estudo. A predominância de tons de verde nos indica um percentual de

similaridade entre 95 e 98% para os genomas. Já para as espécies *A. baumannii* e *A. baylyi*, a predominância de tons amarelos indica uma similaridade entre 70 e 80% para cada uma.

A cepa *A. towneri* DSM 14962, mais próxima à amostra estudada, também possui apenas uma  $\beta$ - lactamase em seu genoma, no entanto essa proteína não corresponde à OXA-58. As ferramentas de alinhamento de nucleotídeos e proteínas utilizadas apontam essa proteína como uma  $\beta$ -lactamase ainda não caracterizada.

Figura 8 - Representação circular da comparação de três genomas de *Acinetobacter* spp., em relação ao genoma da cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02. As regiões em branco representam inserções/ deleções nos genomas.



Fonte: A Autora, 2015

### 13.6.1.2 Subsistemas: Virulência, patogenicidade e defesa/ Transporte de membrana

#### 13.6.1.2.1 Resistência a antimicrobianos

Através da análise pelo RAST, um total de 69 (6,5%) proteínas apresentou funções relacionadas a virulência, patogenicidade e defesa, das quais 60 estão envolvidas na resistência a antibióticos ou antissépticos e nove estão relacionadas a invasão e persistência intracelular.

A busca de genes de resistência a antimicrobianos com o ResFinder apontou a existência de uma  $\beta$ -lactamase, a OXA-58, e do gene *tet(39)*, que confere resistência a tetraciclina, ambos com 100% de identidade com a sequência de referência e ambos localizados em um mesmo *contig* de 29.664pb.

O gene de carbapenemase presente no genoma estudado, *bla*<sub>OXA-58</sub>, foi detectado inicialmente pela PCR multiplex e confirmado através do sequenciamento do gene com os iniciadores da PCR. A sensibilidade aos carbapenêmicos identificada através do método de disco-difusão foi confirmada pela CIM, com valores inferiores a 0,06  $\mu$ g/mL. Para tetraciclina, a amostra também foi sensível, com CIM de 0,06  $\mu$ g/mL (Tabela 26).

A anotação feita pelo RAST mostra o gene *bla*<sub>OXA-58</sub> flanqueado pela sequência de inserção *IS**Aba3*, pertencente à família IS1, e localizado próximo aos genes de resistência a tetraciclina *tetA* e *tetR* (Figura 9). As sequências do *bla*<sub>OXA-58</sub> e a *IS**Aba3* imediatamente adjacentes têm identidade de 100%, utilizando o BLAST, com sequências encontradas em plasmídeos de várias espécies de *Acinetobacter*.

Tabela 26 - Concentração inibitória mínima e categoria de susceptibilidade a antimicrobianos e metais pesados para a cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02.

<b>Grupo</b>	<b>CIM (µg/mL)</b>	<b>Categoria</b>
<b>Antimicrobianos</b>		
Sulbactam	0,5	Sensível
Piperacilina	0,06	Sensível
Ceftazidima	4	Sensível
Imipenem	0,06	Sensível
Meropenem	0,03	Sensível
Doripenem	0,015	Sensível
Ciprofloxacina	1	Sensível
Amicacina	1	Sensível
Gentamicina	0,25	Sensível
Tobramicina	0,5	Sensível
Netilmicina	0,25	Sensível
Tetraciclina	0,5	Sensível
Minociclina	<0,002	Sensível
Doxiciclina	0,03	Sensível
Tigeciclina	0,25	Sensível
Colistina	0,125	Sensível
Ácido clavulânico	4	Sensível
Azitromicina	16	Resistente*
<b>Metais pesados</b>		
Arsênico	>2048	Resistente
Cádmio	64	Sensível
Cobalto	16	Sensível
Cobre	256	Resistente
Cromo	128	Sensível
Telurito	2	Sensível
Zinco	256	Resistente

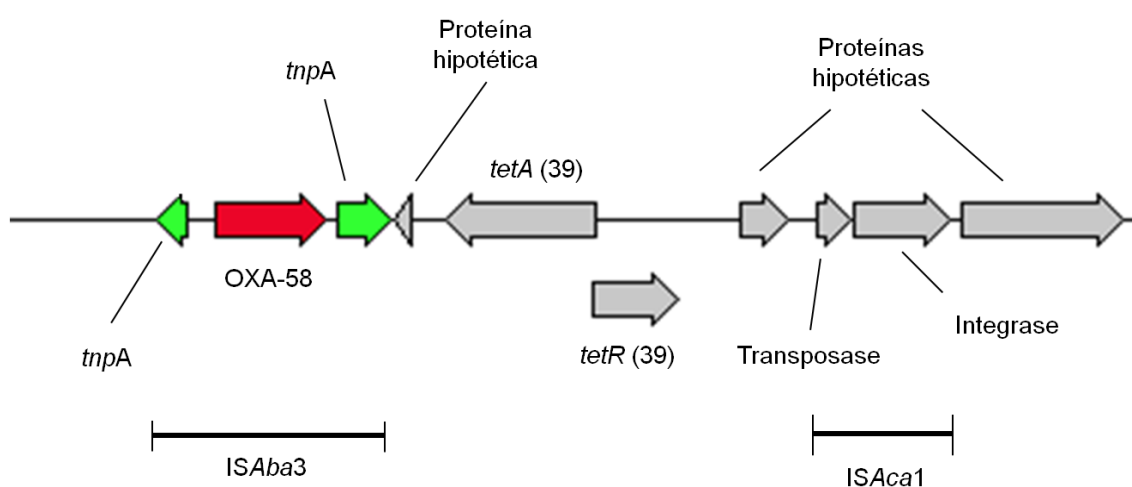
Nota: \*Resistência intrínseca.

Fonte: A Autora, 2015

A transposase da família IS3 e a integrase localizadas na região *downstream* do *bla*<sub>OXA-58</sub> (Figura 9) apresentam identidade de 93% e 89% (cobertura de 100% para ambos), respectivamente, com os elementos móveis presentes em um *cluster*

relacionado à utilização do malonato descrito em *A. calcoaceticus* (nº de acesso AF121266.1) (Koo e Kim, 1999). Essas proteínas compõem uma ISAca1, pertencente à família IS3, subgrupo IS407.

Figura 9 - Representação da região entre os pares de base 20.847 e 28.383 do *contig* de 29.664pb, do genoma da cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, que contém os genes *bla*<sub>OXA-58</sub>, *tetA*(39) e *tetR*(39).



Fonte: A Autora, 2015

Dentro da categoria de “Resistência a antibióticos e compostos tóxicos” no RAST (n=60), 11 (18,3%) genes de bombas de efluxo associados a multirresistência foram observados. Dentre eles, dois genes identificados como *macA* e *macB*, e três cópias do gene que codifica a proteína *TolC* estão presentes em regiões diferentes do genoma de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02. Esses genes são encontrados em todas as cepas de *Acinetobacter* spp. cuja anotação do genoma está disponível no bioservidor RAST. Além dessas proteínas de bombas de efluxo, o RAST aponta a presença de bombas da família MATE (*Multi Antimicrobial Extrusion Protein*), RND (*Resistance Nodulation Division*) e AcrB (resistência a acriflavina).

A anotação individual dos genes que não foram agrupados em nenhum subsistema e a pesquisa através do BLAST (nucleotídico e proteico) e do InterProScan revelaram ainda a presença de outras sequências codificadoras de



proteínas de bombas de efluxo, especialmente da família MFS, além de duas sequências que codificam as proteínas AdeT e outra proteína da família Acr.

O RAST inclui ainda na categoria de “Resistência a antibióticos e compostos tóxicos” (Apêndice B) quatro genes de resistência a fluoroquinolonas: *parC*, *parE*, *gyrA* e *gyrB*, entretanto esses genes não apresentaram nenhuma das mutações que levam ao fenótipo de resistência a essa classe de antimicrobianos.

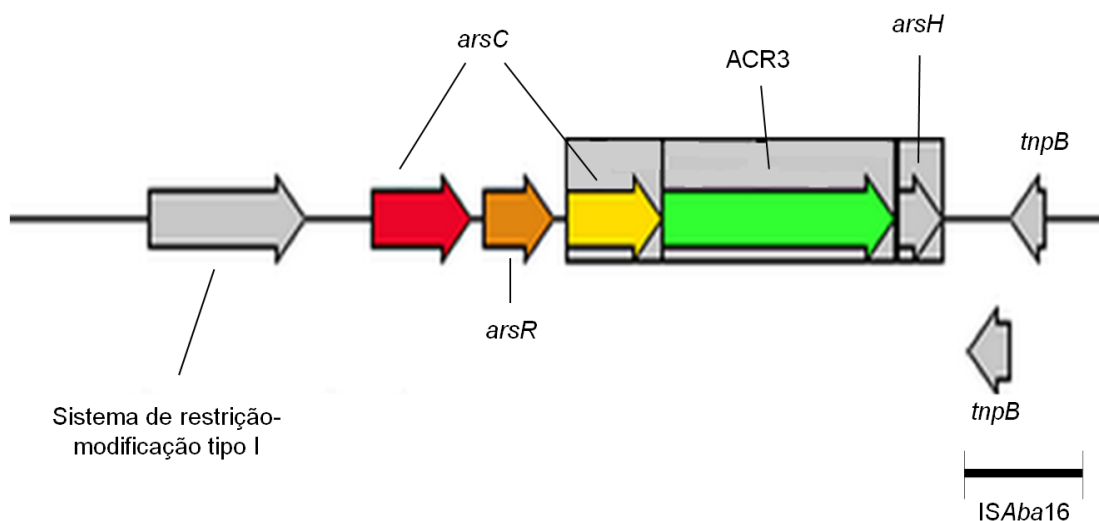
Uma sequência codificadora de uma proteína associada à resistência a bacteriocinas, segundo a anotação do RAST, também foi encontrada no genoma de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02. A análise de cada uma das sequências codificadoras através do BLAST e do InterProScan indicou ainda a presença de outro gene de função semelhante. Ambas as proteínas apresentam um domínio de peptidase C39, relacionado à degradação de bacteriocinas, e localizam-se na membrana.

#### 13.6.1.2.2 Resistência a metais pesados

O genoma da cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 contém dez genes relacionados à resistência a arsênico, cinco dos quais estão organizados em um operon *arsC1-arsR-arsC2-ACR3-arsH* (Figura 10), encontrado em um contig de 11.698pb. A resistência a arsênico foi comprovada fenotipicamente, com um valor de CIM  $\geq 2048 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 26).

Na região *downstream* do operon *ars*, o IS Finder identificou parte de uma IS*Aba16* (Figura 10), pertencente à família IS66, contendo apenas duas fases de leitura aberta (*Open reading frames* - ORFs)– transposases que alinham no BLAST com o gene *tnpB*.

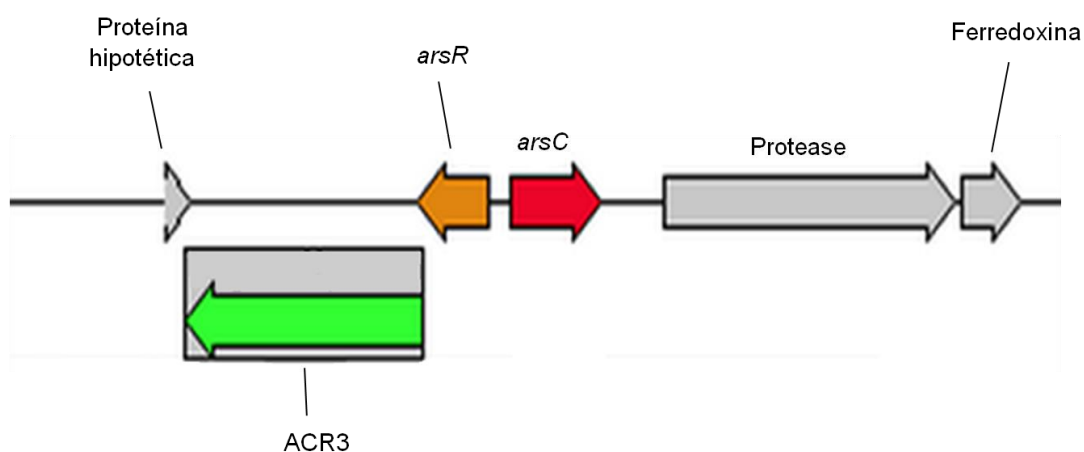
Figura 10 - Representação da região entre os pares de base 6.556 e 11.652 do *contig* de 11.698pb do genoma da cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, que contém o *operon ars* e parte da sequência de inserção IS*Aba16*.



Fonte: A Autora, 2015

Genes *ars* também foram encontrados em outros *contigs*. Em um *contig* de 5.259pb foi encontrado outro *operon ars*, contendo os genes ACR3-*arsR*-*arsC*, em uma orientação diferente do *contig* anterior de 11.698pb (Figura 11). O gene *arsH* e um gene de arsenato redutase (*arsC*) também foram encontrados em outros *contigs*, de 3.630pb e 4.826pb, respectivamente.

Figura 11 - Representação da região entre os pares de base 1.102 e 4.998 do *contig* de 5.259pb, do genoma da cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, que contém um *operon ars* com os genes ACR3, *arsR* e *arsC*.

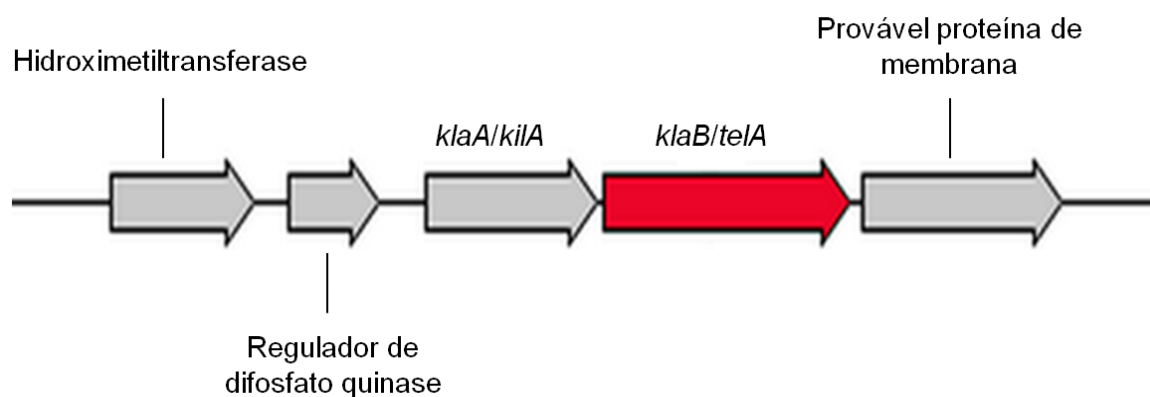


Fonte: A Autora, 2015

Embora a anotação do RAST não tenha indicado uma subcategoria para resistência a telurito dentro do subsistema de “virulência, patogenicidade e defesa”, a anotação individual do RAST para os genes e o BLAST (nucleotídeos e proteínas) mostraram a presença de 15 genes relacionados à tolerância a esse metal. Apesar do alto número de genes detectados, a cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 é sensível a telurito, com CIM de 2 µg/mL (Tabela 26).

Dentre as proteínas codificadas pelo *operon ter* (Anantharaman, Iyer e Aravind, 2012), apenas proteínas da família TerC foram identificadas, num total de quatro genes localizados em regiões distintas do genoma. Além disso, os genes do *operon kil*, *klaA* e *klaB* (Figura 12) estão presentes em um *contig* de 5.306pb do genoma, em associação com um gene que codifica uma proteína de membrana, como descrito previamente (O’Gara, Gomelsky e Kaplan, 1997). Dois conjuntos de genes que formam a tríade TerY-P estão presentes no genoma, em *contigs* de 15.353pb e 31.190pb, nenhum dos conjuntos de genes próximos a genes *ter*.

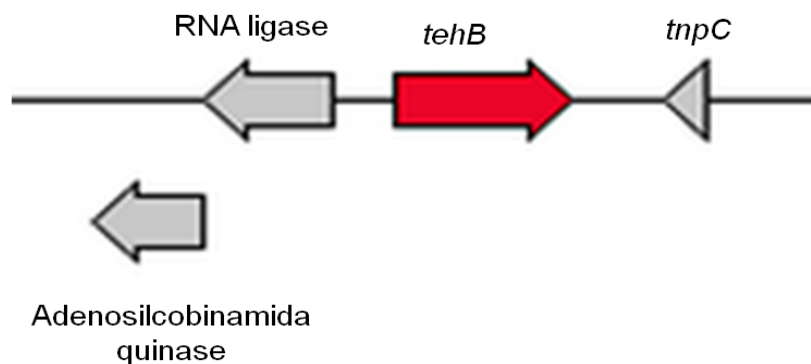
Figura 12 - Representação da região entre os pares de base 48 e 4.384 do *contig* de 5.306pb, do genoma da cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, que contém o *operon* *kilA*.



Fonte: A Autora, 2015

Um gene que codifica a proteína TehB, do *operon* cromossomal *tehAB*, foi encontrado no genoma, em um *contig* de 3.022pb, sem o seu correspondente gene para TehA, indicando que a proteína TehB não é funcional nesse organismo (Figura 13). Na região adjacente ao gene *tehB* existe uma transposase *tnpC*, da família IS66. A inserção desse transposon pode ter ocasionado a perda do gene codificante de TehA.

Figura 13 - Representação da região entre os pares de base 6 e 2.414 do *contig* de 3.022pb, do genoma da cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, que contém o gene *tehB*.



Fonte: A Autora, 2015

Um total de 16 genes relacionados à tolerância a cobre foi identificado no genoma de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02. Entre as proteínas encontradas há: proteínas transportadoras, bombas de efluxo, reguladores de transcrição, chaperonas, redutases e oxidases. O teste fenotípico mostrou uma resistência moderada ao metal, com CIM de 256  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 26). Esse valor é maior que o valor de referência para *E. coli* K12, porém é menor que a CIM obtida para a cepa padrão de *A. baumannii* ATCC® 19606. Dentre essas 16 proteínas, sete alinham no BLAST de nucleotídeos com sequências depositadas no genoma do inseto *D. ponderosae*.

Quinze genes de resistência a cobalto, zinco e cádmio também foram identificados: bombas de efluxo tipo RND, proteínas de transporte de membrana e reguladores transcricionais. Dentre esses metais, a cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 é resistente apenas ao zinco (CIM= 256 $\mu\text{g/mL}$ ). Há ainda três genes associados à resistência a compostos de cromo, entretanto a cepa não expressa fenotipicamente a resistência ao metal (CIM= 128  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 26).

Diversas bombas de efluxo das famílias RND, MFS (*Major Facilitator Superfamily*), DMT (*Drug Metabolite Transporter*), MATE e proteínas transportadoras ABC foram identificadas no genoma estudado. Algumas dessas proteínas estão associadas ao transporte de tolueno, molibdênio e ferro, entre outras moléculas.

### 13. 6.1.2.3 Virulência

Nenhuma proteína foi anotada pelo RAST na subcategoria de virulência, no entanto as demais ferramentas utilizadas para analisar os genes encontrados identificaram cinco proteínas possivelmente associadas a fatores de virulência em *Acinetobacter* e em enterobactérias.

Duas proteínas da família MgtC foram identificadas em regiões diferentes do genoma. Essas proteínas alinham com outras descritas em espécies de *Acinetobacter*, em geral identificadas como proteínas hipotéticas.

Identificada pelo RAST como uma ribonuclease BN, uma proteína com sequência de nucleotídeos semelhante a uma sequência presente no genoma de *A. calcoaceticus* PHEA-2 foi reconhecida tanto pelo BLAST proteico quanto pelo InterProScan como o fator de virulência BrkB (*Bordetella resist killing by serum B*).

Os outros dois genes possivelmente relacionados a virulência incluem uma colagenase, inicialmente descrita em *Bacterioides gingivalis* e uma proteína potenciadora da infectividade em macrófagos, semelhante a proteínas de *Shewanella* spp.

A ferramenta PathogenFinder identificou a cepa em estudo como um possível patógeno humano devido à presença de 26 sequências, variando entre 30 e 2698pb. Entre as proteínas codificadas por essas sequências estão a enzima OXA-58, transposases, proteínas relacionadas à replicação, modificação e recombinação do DNA, reguladores de transcrição, proteínas de transporte de metais pesados e proteínas hipotéticas. As sequências encontradas também estavam presentes em cromossomos e plasmídeos de diversas cepas de *A. baumannii*, incluindo ATCC® 17978, SDF, AYE, e em *A. baylyi* ADP1.

Os genes agrupados na subcategoria de invasão e persistência intracelular têm funções semelhantes às descritas para um *operon* de micobactérias e estão envolvidas com transcrição de DNA e síntese de proteínas.

#### 13.6.1.2.4 Transporte de membrana

Sessenta (5,6%) proteínas foram agrupadas no subsistema relacionado ao transporte de membrana, as quais incluem proteínas de sistemas de secreção tipos I (n= 3), IV (n= 23) e VII (n= 3), e transportadores ABC (n= 3). Além disso, seis proteínas relacionadas ao transporte de cátions foram identificadas: quatro delas envolvidas no transporte de magnésio, duas sequências codificadoras para cada proteína, e duas responsáveis pelo sistema de transporte de cobre.

#### 13.6.1.3 Regulação e sinalização celular/ Dormência e esporulação/ Resposta ao estresse

No subsistema de “Regulação e sinalização celular”, 59 (5,5%) sequências codificadoras de proteínas foram agrupadas, dentre as quais nove (15,3%) são referentes a proteínas da família LysR, semelhantes às encontradas em *E. coli* e em *Salmonella enterica*; seis (10,2%) a proteínas regulatórias órfãs; seis (10,2%) participam da regulação de características de virulência da cepa e duas (3,4%) estão envolvidas com a resposta estrigente (Apêndice B): RelA e SpoT.

Dois genes fazem parte do subsistema relacionado à dormência e esporulação na anotação do RAST. Um dos genes presentes nesse subsistema codifica uma proteína associada à esporulação, *spoVC*. O outro, codifica uma proteína inibidora da divisão celular, *SulA*, que está diretamente associada à formação de células de persistência. A utilização da ferramenta BLAST de nucleotídeos para essa sequência não identificou alinhamento com nenhuma outra sequência disponível no banco de dados, enquanto o BLAST para aminoácidos retornou alinhamentos com sequências de proteínas hipotéticas e com uma epimerase de diversas espécies de *Acinetobacter*, e também com inibidor de divisão celular de *A. gyllenbergii*. A análise do InterProScan classificou a proteína como provável epimerase.

Já o subsistema de resposta ao estresse está composto por 72 (6,7%) proteínas nesta cepa, relacionadas principalmente ao estresse oxidativo, choque térmico (frio e calor) e detoxificação.

A anotação do RAST, em conjunto com as demais ferramentas bioinformáticas aplicadas, revelou ainda a presença de nove cassetes gênicos referentes a quatro tipos diferentes de sistemas toxina-antitoxina no genoma: ParDE, RelBE (4 cassetes gênicos), HipBA (2 cassetes gênicos) e HigBA (2 cassetes gênicos).

#### 13.6.1.4 Fagos, Profagos, Elementos transponíveis e Plasmídeos

A anotação do RAST não identificou nenhuma proteína pertencente ao subsistema relacionado a elementos transponíveis e fagos, entretanto diversas proteínas foram anotadas como elementos móveis e proteínas fágicas. O BLAST de nucleotídeos e proteínas e o InterProScan identificaram ainda outras proteínas de elementos móveis, anotada pelo RAST como proteínas hipotéticas. Cerca de 110 proteínas ( $\approx 4\%$  das sequências codificadoras do genoma) relacionadas com elementos móveis foram identificadas por no mínimo uma das ferramentas citadas, dentre as quais 38 alinharam com sequências depositadas como pertencentes ao genoma do inseto *D. ponderosae*.

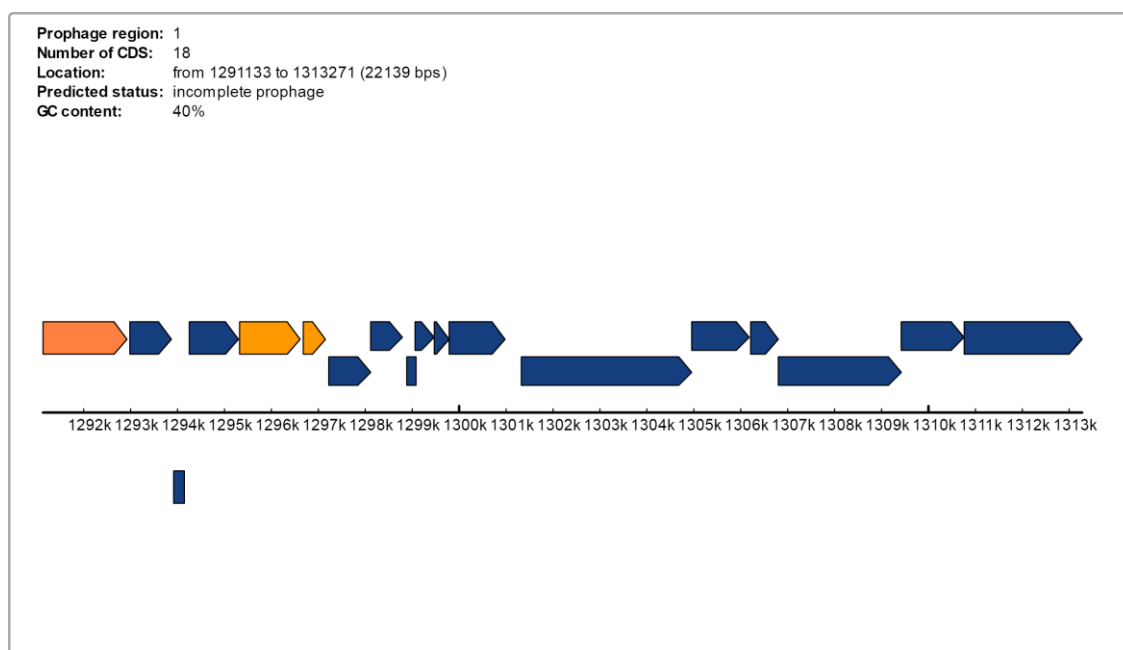
A maioria das proteínas de elementos móveis são transposases contidas em diversas famílias de sequências de inserção: IS1, IS3, IS4, IS17, IS66, IS100, IS200. Entre as IS identificadas pelo IS Finder estão: *ISAb1*, 2, 5, 7, 8, 11,12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 29, 125 de *A. baumannii*; *ISAc1*, *IS1008* e *IS1236* de *A. calcoaceticus*; *IS17*, *ISAha1*, 2 e 3 de *A. haemolyticus*; *ISAlw1* de *A. lwoffii*, *ISAjo1* de *A. johnsonii* e *IS18* de *Acinetobacter* sp. Sequências de inserção de outros gêneros também foram encontradas, como *ISPPu12* de *Pseudomonas putida*, *IS15DIV* de *Salmonella typhimurium*.

Dentre as proteínas fágicas encontradas no genoma, estão transposases, integrases, recombinases, reguladores transcricionais - incluindo repressores de profagos, lisozimas, proteínas ligantes de DNA, proteínas de replicação de DNA, proteínas de membrana e diversas proteínas hipotéticas.



Além disso, ferramenta PHAST, especializada na busca de genes de fagos em genomas, identificou a existência de um profago incompleto com 22.139pb e 18 regiões codificadoras de proteínas. Essas proteínas são semelhantes às do bacteriófago F116 de *P. aeruginosa*. O profago incompleto encontrado no genoma do *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 é formado por uma proteína portal, duas proteínas com estrutura semelhante a proteínas fágicas e 15 proteínas hipotéticas (Figura 14).

Figura 14 - Profago incompleto identificado pelo PHAST no genoma da cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02. As setas azuis representam proteínas hipotéticas e as setas alaranjadas referem-se uma proteína portal e outras proteínas fágicas.



Identified CDS types:

	1 Lysis		2 Terminase		3 Portal
	4 Protease		5 Coat		6 Tail shaft
	7 Attachment site		8 Integrase		9 Other phage-like protein
	10 Hypothetical protein		11 Other		12 Transposase
	13 Tail fiber		14 Plate		15 tRNA

Fonte: A Autora, 2015

## 14 DISCUSSÃO

### 14.1 Coletas de superfícies

Não houve uma diferença expressiva entre o número de amostras de BGNNF e enterobactérias isoladas a partir das coletas de superfícies. Como esperado, as pias foram os sítios de coletas com maior isolamento de BGN, e apresentaram uma proporção amostras/ nº de *swabs* cinco vezes maior do que para os carrinhos de enfermagem e respiradores, uma vez que a alta umidade relativa promove a sobrevivência dos micro-organismos no ambiente (Weber *et al.*, 2010).

A ausência de detecção de BGN nas superfícies da bancada de preparo de medicamentos do posto de enfermagem e na mesa de reuniões aponta para uma higienização adequada, tanto da própria superfície quanto das mãos dos PAS no momento de utilizar esses ambientes. Entretanto, esses resultados também podem indicar uma falha da técnica empregada na detecção de níveis baixos de contaminação (Manian, Griesnauer e Senkel, 2013).

A mudança no protocolo de limpeza do CTI do HUPE, que incluiu a implementação do uso de um novo desinfetante e treinamento de profissionais, não ocasionou a redução significativa do número de BGN isolados a partir de nenhuma das superfícies avaliadas individualmente, embora tenha havido uma redução visível do número de micro-organismos isolados a cada coleta. Técnicas de coleta quantitativas para as superfícies seriam mais adequadas para determinar a verdadeira influência do novo protocolo nos níveis de contaminação das superfícies do CTI (Manian, Griesnauer e Senkel, 2013).

Nas superfícies dos carrinhos de enfermagem predominaram as enterobactérias, sendo *K. pneumoniae* a espécie mais relevante. Amostras de *Acinetobacter* spp. só foram isoladas no mês de março, provavelmente devido à presença de pacientes colonizados por esse micro-organismo nos leitos em que houve o isolamento (Mattner *et al.*, 2012; Weber, Anderson e Rutala, 2013).

Entre os meses de janeiro e julho de 2012, *Acinetobacter* spp. foi o micro-organismo mais recuperado em culturas clínicas feitas a partir de materiais de origem respiratória, representando 66,7% das culturas realizadas no período (dados

não mostrados). O segundo micro-organismo mais isolado foi *P. aeruginosa*, em apenas 14% das culturas. A ocorrência apenas de BGNNF nos botões dos respiradores aponta para uma relação direta entre as bactérias presentes em secreções respiratórias dos pacientes e aquelas contaminando o respirador. A contaminação dessa superfície normalmente ocorre através das mãos e luvas de PAS, que tocam o equipamento logo após o contato com o paciente (Weber *et al.*, 2010; Morgan *et al.*, 2012; Weber, Anderson e Rutala, 2013).

A diferença nos micro-organismos predominantemente encontrados nos botões das bombas infusoras e dos respiradores e aqueles encontrados nas superfícies dos carrinhos de enfermagem indicam que esses equipamentos foram contaminados em momentos diferentes do cuidado ao paciente, através das luvas dos PAS.

O isolamento de enterobactérias foi cinco vezes maior nas superfícies do que no ar, sendo a espécie *K. pneumoniae* e o CEC os micro-organismos mais relevantes, tanto por seus percentuais de resistência quanto pela produção da carbapenemase KPC e enzimas ESBL. Essas espécies também foram as mais frequentemente isoladas, dentre as enterobactérias, nas culturas de amostras clínicas (dados não mostrados).

Embora um percentual baixo de amostras MDR tenha sido recuperado de superfícies do ambiente hospitalar, a presença de cepas produtoras de KPC é alarmante, devido à alta capacidade de disseminação desse gene entre diversas espécies bacterianas, tanto de enterobactérias quanto de BGNNF. Além disso, seguindo rigorosamente os critérios de interpretação definidos para o teste fenotípico de detecção de carbapenemases, duas amostras do CEC não teriam sido classificadas como produtoras de KPC e, portanto, não seriam encaminhadas para a confirmação molecular da presença do gene *bla<sub>KPC</sub>*. Nesse estudo, o teste molecular foi aplicado em qualquer situação de redução de halo para pelo menos um dos carbapenêmicos testados.

A prevalência de amostras de *P. aeruginosa* nos ralos das pias do CTI é condizente com a forte relação desse micro-organismo com ambientes úmidos (Paterson, 2006). Durante os meses avaliados nesse estudo, 12 (12,2%) das culturas do CTI foram positivas para *P. aeruginosa*, atrás apenas de *Acinetobacter* spp. O isolamento das únicas cepas da espécie com perfil de multirresistência e resistência a carbapenêmicos, aminoglicosídeos ou quinolonas a partir de

superfícies sugere uma maior probabilidade de esses micro-organismos serem semelhantes àqueles encontrados nas amostras clínicas (dados não mostrados), enquanto as amostras isoladas de ar estão mais relacionadas ao ambiente.

Apesar de *P. aeruginosa* ter sido a espécie mais isolada a partir dos ralos das pias do CTI, apenas *S. marcescens* foi isolada em todos os meses de coleta. Entre os meses de janeiro e julho de 2012, apenas três hemoculturas coletadas no CTI-HUPE foram positivas para *S. marcescens* e uma para *Serratia* spp., todas provenientes de um mesmo paciente e duas delas produtoras de ESBLs (dados não mostrados).

Nove entre as dez cepas da espécie foram isoladas a partir de uma mesma pia, revelando a persistência de *S. marcescens* nesse ambiente úmido ao longo de sete meses e caracterizando essa pia como um reservatório ambiental desse micro-organismo. Ao menos uma amostra com resistência apenas a cefalotina foi isolada por mês, apontando para a manutenção de uma mesma cepa. No mês de julho, outras duas cepas produtoras de ESBL foram isoladas dessa pia. Estudos de tipificação molecular, através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE), são necessários para avaliar a clonalidade dessas cepas.

Manian, Griesnauer e Senkel (2013) encontraram *A. baumannii* MDR em superfícies próximas ao leito e no monitor cardíaco após a limpeza terminal. Os leitos em que foi detectada a presença de AbRC após a limpeza terminal estavam previamente ocupados por pacientes colonizados ou infectados por esse micro-organismo. Apesar de amostras permanecerem positivas após a limpeza, a contagem de colônias foi significativamente mais baixa.

Já no CTI-HUPE, a coleta qualitativa de superfícies realizada após a limpeza terminal em apenas um dos leitos, não identificou o crescimento de nenhum BGN. Esse resultado pode significar tanto a real ausência de contaminação por BGN quanto a falha na detecção de baixos níveis de contaminação. De qualquer maneira, os resultados encontrados para as coletas de ar e de superfícies apontam para uma limpeza terminal satisfatória, porém a avaliação de apenas um leito é insuficiente para determinar a eficiência da limpeza realizada no setor. Embora não sejam conhecidas as informações do paciente internado nesse leito imediatamente antes da limpeza terminal, a elevada frequência de colonização/ infecção comum em unidades de pacientes críticos sugere uma alta probabilidade de que o paciente estivesse colonizado ou infectado por algum BGN.

## 14.2 Coletas de ar

A contagem de colônias para a coleta quantitativa do ar revelou uma diminuição do número de colônias ao longo dos meses, especialmente nos dois últimos meses de coleta, o que pode ter sido reflexo não da implementação de novos protocolos de limpezas concorrente e terminal, uma vez que estas visam apenas à desinfecção de superfícies, porém de uma maior conscientização tanto dos profissionais da limpeza quanto dos PAS no setor, em decorrência do treinamento oferecido.

Tang e Wan (2013) realizaram um estudo em um hospital de Taiwan a fim de determinar a qualidade do ar nas áreas cirúrgicas de um hospital e seus arredores (sala de recuperação, sala de instrumentos, sala de materiais, escritório e lanchonete), durante um ano, avaliando parâmetros como temperatura, umidade e quantidade de bactérias. Uma vez que a sala de recuperação pós-cirúrgica também é responsável pelo tratamento de pacientes críticos, embora por períodos mais curtos, e apresenta uma alta densidade de pessoas, podemos comparar esses resultados com os obtidos no CTI-HUPE.

A contagem máxima observada no CTI-HUPE, levando-se em consideração todas as coletas de todos os pontos, foi de 374 UFC/m<sup>3</sup>, em uma ocasião em que havia uma enfermeira realizando procedimentos no leito durante a coleta. Esse valor é muito similar ao valor máximo observado por Tang e Wan (2013), de 383,5 UFC/m<sup>3</sup> na sala de recuperação pós-cirúrgica. Em outras ocasiões em que também havia um profissional de enfermagem no leito, as contagens foram mais baixas: 51 e 24 UFC/m<sup>3</sup>. Essa diferença pode ser devida ao procedimento realizado ou ao tempo de permanência desse profissional no leito durante a coleta.

Os menores valores de contagem de colônias, 12 e 17 UFC/m<sup>3</sup>, foram observados em leitos ocupados, nos meses de junho e julho, e não nas áreas mais afastadas de pacientes (posto de enfermagem, sala de reuniões e saída do expurgo). Considerando o número total de UFC recuperados em todos os meses de coleta nas áreas afastadas de pacientes, a saída do expurgo apresentou maior nível de contaminação do ar, seguida pelo posto de enfermagem e pela sala de reuniões. Esses resultados apontam para a relevância da formação de aerossol no tratamento

do expurgo na disseminação de micro-organismos presentes nesse aerossol para a área de pacientes.

Embora haja cada vez mais estudos sobre a contaminação de superfícies hospitalares por patógenos MDR, pouco ainda é conhecido sobre a presença desses micro-organismos no ar de ambientes hospitalares (Ho *et al.*, 2009). Um total de seis amostras MDR foram isoladas a partir do ar do CTI-HUPE: três AbRC, uma *K. pneumoniae* produtora de KPC e ESBL e duas enterobactérias produtoras de ESBL. A presença de BGN-MDR no ar é alarmante, uma vez que significa a possibilidade de disseminação desses micro-organismos para outros sítios em um mesmo paciente, para pacientes posteriormente admitidos em leitos cujo ar estava contaminado e para a superfícies e equipamentos do leito, mesmo depois de desinfetadas pelos profissionais da limpeza (Spellberg e Bonomo, 2013).

Dentre os BGNNF identificados em amostras de ar do CTI-HUPE, *Acinetobacter* spp., *A. baumannii*, *Pseudomonas* spp. e *Stenotrophomonas* spp. já haviam sido descritas no ar de ambientes hospitalares (Tang e Wan, 2013).

Apesar dos altos valores de contagens de colônias para posto de enfermagem, sala de reuniões e saída do expurgo, poucos BGN foram isolados a partir do ar coletado, dentre os quais apenas três tinham perfil de multirresistência: duas amostras de AbRC isoladas do posto de enfermagem e uma do CEC produtora de ESBL isolada da saída do expurgo.

Os resultados da coleta quantitativa do ar em janeiro revelaram a presença de 92 UFC/m<sup>3</sup> no leito 2 após a realização da limpeza terminal, porém apenas três BGN foram observados: dois BGNNF e um CEC sensível à maioria dos antimicrobianos testados. Embora a contagem de colônias ainda seja alta em relação a outros resultados obtidos em leitos ocupados, a ausência de BGN-MDR no ar indica uma reduzida probabilidade de disseminação desses micro-organismos por via aérea nesse leito.

Pôde-se observar um padrão epidemiológico para os gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas*: as amostras do ar pertencem a espécies não relacionadas frequentemente a IrAS, mais sensíveis aos antimicrobianos, enquanto as amostras das superfícies apresentam características de resistência a antimicrobianos semelhantes às de amostras clínicas. Para *A. baumannii*, por exemplo, o perfil de resistência e de genes de oxacilinas são semelhantes aos de cepas já descritas nessa unidade do HUPE em trabalhos anteriores (Silva, 2010; Barbosa, 2011).

Devido à importância do gênero *Acinetobacter* em unidades de pacientes críticos, sua presença no ar de diversas áreas do CTI-HUPE, com cepas portadoras de mecanismos de resistência aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de BGN, chamou atenção para o papel da disseminação aérea na epidemiologia do *Acinetobacter* - tema ainda em expansão.

No estudo desenvolvido por Tang e Wan (2013), o gênero *Acinetobacter* foi o mais isolado no ar das salas de recuperação pós-cirúrgica, de instrumentos e na sala de cirurgia de trauma. Em outro estudo, somente uma amostra de *A. baumannii* foi observada no ar coletado próximo ao leito durante realização de procedimentos de enfermagem, através de uma técnica para avaliar da disseminação da espécie por aerossol, que consistia em deixar placas abertas a distâncias definidas sobre a cama ou no chão (Ho *et al.*, 2009). A técnica de coleta de ar com o uso de um aparelho para sucção de um volume específico de ar certamente é mais sensível na detecção da presença de micro-organismos no ar, já que aumenta a probabilidade de um micro-organismo presente no ar entrar em contato com o meio de cultura.

Em um total de 57 coletas de ar dos diversos pontos do CTI-HUPE, dez amostras de *Acinetobacter* spp. foram isoladas, sendo apenas três (5,3%) identificadas como AbRC - duas a partir do posto de enfermagem e uma isolada do ar do leito 6. Em um estudo realizado em um centro de terapia intensiva de trauma, de 12 culturas positivas para AbRC foram obtidas em 53 coletas (22,6%), todas isoladas em leitos ocupados por pacientes colonizados ou infectados por esse micro-organismo (Muñoz-Price *et al.*, 2013). No nosso estudo, a frequência de isolamento de AbRC foi cerca de quatro vezes menor que a descrita por Muñoz-Price e colaboradores (2013) para outra unidade de terapia intensiva, apesar de esse patógeno ser endêmico no CTI-HUPE. Essa observação indica um baixo potencial de transmissão aérea de desse patógeno na unidade. Entretanto, o fato de AbRC ter sido encontrado no ar de regiões distantes dos pacientes sugere um potencial de disseminação dessas cepas entre leitos fisicamente separados através do ar.

Uma das limitações das coletas de ar do presente estudo foi a ausência de acompanhamento de outros fatores que também podem influenciar na contagem de colônias coletadas do ar, como a temperatura e a umidade (Spellberg e Bonomo, 2013; Tang e Wan, 2013).

Outros estudos são necessários para determinar se a contaminação do ar por BGN-MDR aumenta o risco de infecção para os pacientes internados em leitos onde foi detectada a contaminação e para pacientes de leitos próximos. Além disso, a tipificação molecular das amostras ambientais e clínicas das espécies mais relevantes do estudo é necessária para comprovar a relação clonal entre essas amostras. Dessa maneira, será possível determinar um perfil epidemiológico dos principais bacilos Gram-negativos na unidade de terapia intensiva.

### 14.3 *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02

Durante a execução do trabalho, o isolamento de uma amostra de Anb no ar de um dos leitos apresentou uma característica interessante, que nos motivou a aprofundar o estudo dessa cepa: a presença silenciosa de um gene de carbapenemase. A técnica de sequenciamento do genoma foi utilizada inicialmente para determinar o entorno desse gene e as possíveis causas do seu fenótipo de sensibilidade.

Os métodos aplicados para a identificação de espécie para a cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 não foram capazes de associar o perfil de proteínas ou o genoma a nenhuma das espécies descritas de *Acinetobacter*, uma vez que os parâmetros utilizados para classificar amostras como uma determinada espécie não foram atingidos para nenhuma das técnicas aplicadas.

Os resultados de comparação de genomas (ANI e da avaliação filogenética baseada em SNPs), corroborados pelo perfil proteico analisado por MALDI-TOF MS, indicam que a cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 representa uma nova espécie, semelhante a *Acinetobacter towneri*. Embora ainda não esteja padronizada como ferramenta para identificação de novas espécies bacterianas, estudos já propõem novas nomenclaturas com base nos resultados do ANI (Chan *et al.*, 2012; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2014; Baek *et al.*, 2015), baseados em dados concretos da capacidade discriminatória da técnica (Richter e Rosselló-Móra, 2009).

A análise das sequências codificadoras de proteínas nas ferramentas do BLAST de nucleotídeos e proteínas foi bastante útil para aprofundar o conhecimento acerca das similaridades entre os genes de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 e outras



espécies bacterianas e de eucariotos. Apesar de diversos genes terem sido identificados pelo BLAST como parte do genoma do inseto *D. ponderosae*, na realidade eles fazem parte do genoma de um *Acinetobacter* sp. que colonizava o sistema digestivo deste animal (Keeling *et al.*, 2013). Essa espécie não ocorre no Brasil, entretanto outra espécie do gênero, *Dendroctonus frontalis*, é considerada uma praga nas plantações de pinheiros do sul do país (BRASIL, 21 nov. 2007). A similaridade observada entre os genes dessas cepas de *Acinetobacter* indica a microbiota intestinal de insetos como uma possível origem ambiental para *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02.

Avanços recentes em técnicas moleculares, especialmente o sequenciamento de genomas completos, têm sido utilizados para redefinir e descobrir espécies, sendo capaz de considerar a plasticidade exibida pelos genomas de micro-organismos (Diene *et al.*, 2013). Para analisar o extenso conjunto de dados fornecidos pelo sequenciamento de genomas, alguns conceitos emergiram na literatura, descritos de maneira resumida por Diene e colaboradores (2013):

a) Resistoma: todos os genes envolvidos, direta ou indiretamente, na resistência a qualquer composto com atividade antimicrobiana.

b) Mobiloma: conjunto de genes móveis que inclui plasmídeos, transposons, bacteriófagos e elementos integrativos e conjugativos, capazes de serem transferidos horizontalmente entre micro-organismos, através de transformação, conjugação e transdução.

Com base nesses conceitos e na praticidade que eles oferecem à análise de uma grande quantidade de informação genética, utilizamos também nesse estudo o termo *Persistoma*, englobando os genes de alguma maneira envolvidos na persistência de um micro-organismo a condições ambientais menos favoráveis.

#### 14.3.1 Resistoma

A maioria das pesquisas sobre a resistência a antimicrobianos é voltada apenas para micro-organismos patogênicos, apesar de se conhecer a dispersão de genes de resistência em espécies ambientais não-patogênicas, negligenciando um grande número genes de resistência ainda desconhecidos (Wright, 2010). De fato,

uma única cepa ambiental avaliada em profundidade neste estudo revelou a presença de diversos genes de resistência a antimicrobianos e compostos tóxicos.

Uma das características mais interessantes da cepa sequenciada é a CIM muito baixa para os carbapenêmicos, apesar da presença de uma cópia da sequência completa do gene que codifica a carbapenemase OXA-58, flanqueada por sequências de inserção IS*Aba3* nas regiões *upstream* e *downstream*. O gene *bla*<sub>OXA-58</sub> nunca havia sido descrito em cepas de *Acinetobacter* spp. isoladas no HUPE (Silva, 2010; Barbosa, 2011; Lobo, 2012). Apesar de essa enzima apresentar uma atividade hidrolítica fraca para os carbapenêmicos, sua atividade é suficiente para reduzir a sensibilidade a esses antimicrobianos em até oito vezes (Poirel *et al.*, 2005).

Embora valores mais altos de CIM estejam associados à presença de múltiplas cópias do *bla*<sub>OXA-58</sub> (Bertini *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2010), cepas que, como o *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, possuem apenas uma cópia do gene, apresentam CIM de até 16 µg/mL (Merkier *et al.*, 2008). Além disso, a presença de uma sequência de inserção na região *upstream* está associada a um aumento significativo da expressão do gene, e, conseqüentemente, à resistência aos carbapenêmicos (Poirel e Nordmann, 2006; Fu *et al.*, 2014).

O entorno genético do *bla*<sub>OXA-58</sub> encontrado na cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, com a presença de uma IS*Aba3*-like íntegra na região *upstream* do gene, na direção contrária à do gene, enquanto a IS*Aba3* presente na região *downstream* está na mesma direção do *bla*<sub>OXA-58</sub>, já foi descrita em amostras clínicas tanto da espécie *A. baumannii* quanto de outras espécies de *Acinetobacter* (Poirel *et al.*, 2005; Marti *et al.*, 2008; Boo e Crowley, 2009; Evans *et al.*, 2010).

Cepas clínicas de Anb portadoras do gene *bla*<sub>OXA-58</sub>, porém sensíveis a carbapenêmicos têm sido descritas em diversos estudos (Boo e Crowley, 2009; Fu *et al.*, 2014; Zander *et al.*, 2014). Amostras das espécies *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. bereziniae* e *A. lwoffii* com CIMs que variam entre 0,125 e 1µg/mL para imipenem e entre 0,5 e 2µg/mL para meropenem e com um entorno genético do *bla*<sub>OXA-58</sub> similar ao encontrado em *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 já foram observadas em diversas regiões do mundo (Boo e Crowley, 2009; Fu *et al.*, 2014).

Alguns autores acreditam que a inserção de outra IS na IS*Aba3*-like da região *upstream* do *bla*<sub>OXA-58</sub>, construção comum em amostras clínicas, principalmente da espécie *A. baumannii*, crie um promotor híbrido mais forte que o fornecido pela

IS*Aba3-like* intacta, aumentando significativamente a expressão do gene da carbapenemase (Boo e Crowley, 2009; Fu *et al.*, 2014).

A presença de genes codificantes de carbapenemases tipo OXA em amostras de *Acinetobacter* spp. sensíveis a carbapenêmicos aponta para a ameaça que essas cepas podem representar como reservatórios de genes de resistência a carbapenêmicos, uma vez que a detecção molecular desses genes e a consequente implementação de medidas de controle de infecção só são realizadas para amostras com fenótipo de multirresistência (Boo e Crowley, 2009).

Os genes de resistência a tetraciclina reconhecidos pela anotação do RAST apresentam 100% de identidade com os genes *tetA(39)* e *tetR(39)*, e foram descritos inicialmente na cepa ambiental *Acinetobacter* sp. LUH5605, isolada de tanques de piscicultura na Dinamarca (Agersø e Guardabassi, 2005). Esses genes codificam uma proteína transmembrana pertencente à família MFS (*Major Facilitator Superfamily*) e um repressor, respectivamente, e conferem resistência especificamente a este antibiótico através de um mecanismo de expulsão ativa (Agersø e Guardabassi, 2005).

Apesar de os genes *tetA(39)* e *tetR(39)* estarem dispostos em orientações opostas, como descrito para genes *tetA* em diversas espécies bacterianas de Gram-positivos e Gram-negativos (Agersø e Guardabassi, 2005; Adelowo e Fagade, 2009), *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 não apresenta o fenótipo de resistência a tetraciclina.

Os genes *tet(39)* já foram descritos em diversos *Acinetobacter* spp. clínicos e ambientais, isolados de diferentes regiões geográficas, o que sugere que esses genes estejam disseminados no gênero. Análises filogenéticas mostraram que TetA(39) é mais próxima da bomba de efluxo de tetraciclina TetA(30), encontrada em *Agrobacterium tumefaciens* originada do solo (Agersø e Guardabassi, 2005), indicando a importância desses genes para a adaptação em nichos com uma comunidade bacteriana diversificada. A presença de *tetA(39)* é geralmente descrita em plasmídeos e associada a um fenótipo de resistência a tetraciclina (Agersø e Guardabassi, 2005; Agersø e Petersen, 2007), logo novos estudos de expressão são necessários para determinar as causas do fenótipo de susceptibilidade em *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02.

A presença de genes que codificam as proteínas MacA, MacB e TolC é condizente com o fenótipo de resistência aos macrolídeos, considerado intrínseco ao

gênero *Acinetobacter*, uma vez que essas três proteínas atuam em conjunto na extrusão dos antimicrobianos.

Apesar de não possuir um genoma adaptado a um ambiente com elevada pressão de antimicrobianos, como é uma unidade hospitalar de pacientes críticos, a cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 possui genes que possibilitam sua sobrevivência em ambientes externos, onde influem diversos fatores nutricionais e onde há uma comunidade microbiana mais diversa. Muitos desses genes também são capazes de facilitar sua sobrevivência no ambiente hospitalar. Os genes relacionados à resistência a bacteriocinas são um exemplo claro disso.

As bacteriocinas são proteínas ou peptídeos com atividade antimicrobiana de amplo espectro, que podem ser encontradas tanto em micro-organismos Gram-positivos quanto em Gram-negativos, e que não são tóxicas para células eucarióticas. Essas moléculas são mais estudadas em micro-organismos Gram-positivos, pelas suas possíveis aplicações biotecnológicas. A maioria das bacteriocinas provoca a morte celular por permeabilização da membrana e formação de poros. Os mecanismos de defesas das bactérias contra essas proteínas variam de acordo com a classe de bacteriocina em questão. Esses mecanismos, em geral, envolvem proteínas ancoradas ou inseridas na membrana celular, que atuam bloqueando a ligação da bacteriocina ou protegendo um alvo específico, e são complementados por proteínas transportadoras tipo ABC (Bastos, Coelho e Santos, 2014).

A degradação de bacteriocinas é considerada um mecanismo de resistência intrínseco e específico para essas proteínas (Bastos, Coelho e Santos, 2014). Transportadores ABC que contêm um domínio de peptidase C39, como as proteínas encontradas em *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, são capazes de cortar o peptídeo líder presente no substrato. Esse domínio é conservado em transportadores ABC de bacteriocinas (Kanonenberg, Schwarz e Schmitt, 2013).

Dentre os poucos compostos tóxicos a que a cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 apresentou fenótipo de resistência, o arsênico destaca-se pelo valor elevado da CIM. Os micro-organismos cultiváveis resistentes a arsênico e dominantes em solos contaminados por metais fazem parte de gêneros comuns em solos. Diversos estudos reportam *Acinetobacter* spp. como um desses gêneros dominantes em solos com alto nível de contaminação por metais (Turpeinen, Kairesalo e Häggblom, 2004; Cai, Liu, *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2014). Um estudo conduzido por

Macnaughton e colaboradores (1999) mostrou que a mudança mais significativa observada na estrutura da comunidade microbiana em solos tratados com metais foi o aparecimento de *Acinetobacter* spp. e *Burkholderia* spp., não detectadas nos controles.

Amostras isoladas de solos com altos níveis de contaminação por arsênico geralmente apresentam maior resistência a arsenito que aquelas isoladas a partir de solos com níveis baixo ou intermediário de contaminação (Cai, Liu, *et al.*, 2009). Turpenein e colaboradores (2004) demonstraram que cepas isoladas de solos contaminados apresentavam uma resistência relativamente alta a As(III) e As(V), entre elas *A. radioresistens* e *A. baumannii* eram extremamente resistentes, crescendo em até 20 mg/mL de As(III) ou As(V), indicando que *Acinetobacter* spp. são capazes de crescer a altas concentrações biodisponíveis de arsênico. O elevado valor de CIM para *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, portanto, indica que seu ambiente de origem provavelmente apresenta níveis intermediários ou altos de contaminação por arsênico, em que pode ocorrer uma co-seleção de genes de resistência a antimicrobianos (Gullberg *et al.*, 2014).

A disposição de genes no *operon ars* encontrada no genoma de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 foi descrita apenas para a cepa *Pseudomonas stutzeri* TS44 e é similar à estrutura do *operon* da cepa *Pseudomonas putida* W619. Em *P. stutzeri* TS44, a expressão dos genes *arsC1-arsR*, aparentemente, é constitutiva (Cai, Rensing, *et al.*, 2009), entretanto estudos de expressão desses genes são necessários para verificar sua atividade na cepa estudada.

A sequência de inserção na região *downstream* do *operon ars*, identificada como IS*Aba16*, apresenta apenas duas ORFs, uma a menos do que é descrito para essa IS (Lopes, Evans e Amyes, 2012), o que indica que ela pode estar truncada no genoma de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02.

Dentre as proteínas transportadoras de As(III), apenas Acr3 foi encontrada em *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, reforçando a ideia de sua predominância em relação a ArsB (Cai, Liu, *et al.*, 2009). As proteínas Acr3 aparentam estar mais relacionados a resistência elevada a arsenito, uma vez que só foram identificadas em amostras oriundas de solos com níveis de contaminação por arsênico alto ou intermediário, enquanto *arsB* também foi encontrado em amostras de solos com baixos níveis de contaminação. É provável que Acr3 tenha maior afinidade e velocidade na extrusão do arsenito que ArsB, portanto, aparenta ser mais efetiva (Cai, Rensing, *et al.*, 2009;

Costa *et al.*, 2014). A presença de Acr3 ao invés de ArsB em *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 corrobora a possível origem da cepa em um ambiente exposto a altas concentrações de arsênico.

Ainda há poucos estudos sobre os determinantes de tolerância ou resistência a telurito no gênero *Acinetobacter*. Apenas o *operon ter* foi descrito como um importante determinante da resposta ao dano oxidativo causado pela exposição ao telurito, em *A. baylyi*, associado a uma proteína de fase estacionária (Reichert *et al.*, 2013). O genoma de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 não possui todos os genes *ter* considerados essenciais para um fenótipo de tolerância ao telurito, portando apenas o gene *terC*. O único operon relacionado à tolerância/ resistência a esse metal que aparece completo no genoma estudado é o *operon kila*. Outros estudos são necessários, no entanto, para determinar sua funcionalidade nessa cepa.

A resistência moderada a cobre observada na cepa estudada chama a atenção para a tolerância a cobre no ambiente hospitalar, uma vez que superfícies como maçanetas, assentos de banheiros e puxadores de camas revestidos com cobre ou ligas desse metal estão sendo cada vez mais utilizadas para reduzir a contaminação nessas superfícies. Apesar de as bactérias apresentarem diversos mecanismos de tolerância ao cobre, esses não são capazes de protegê-las da morte por contato com o metal, apenas aumentam o tempo de sobrevivência (Grass, Rensing e Solioz, 2011).

Estudos realizados para determinar o tempo de ação da morte por contato com o cobre mostraram que, quando inoculadas em uma suspensão líquida, *A. baumannii* sobrevive cerca de 180 minutos (Mehtar, Wiid e Todorov, 2008). Já para a inoculação de *A. johnsonii* com a utilização de um *swab* embebido em inóculo e deixado para secar, o tempo de sobrevivência foi de apenas alguns minutos (Espírito Santo, Morais e Grass, 2010). Acredita-se que a atividade antimicrobiana seja maior nas superfícies de cobre secas, cenário mais comum no ambiente, do que nas úmidas (Grass, Rensing e Solioz, 2011).

A virulência do gênero *Acinetobacter* é considerada baixa em relação a outros patógenos hospitalares, entretanto fatores de virulência importantes, como a formação de biofilme e aderência, já foram descritas (Fariñas e Martínez-Martínez, 2013; Gianoulli *et al.*, 2013). No genoma da cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, poucos genes ligados a virulência foram encontrados. A sequência codificadora da proteína MgtC, presente em duas cópias, é encontrada geralmente em um *operon*, junto à

proteína MgtB (transportadora de  $Mg^{2+}$ ), ausente em *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02. A expressão da MgtC é necessária para replicação de patógenos intracelulares dentro de macrófagos e para o crescimento em meios com baixa concentração de  $Mg^{2+}$  (Rang *et al.*, 2007). Já a proteína BrkB, inicialmente classificada como ribonuclease BN (Callahan e Deutscher, 1996), é essencial para a resistência de *Bordetella pertussis* à morte causada pelo sistema complemento do soro humano (Fernandez e Weiss, 1994) e proteínas semelhantes já foram descritas para *E. coli* e *Mycobacterium tuberculosis* (Kelly e Deutscher, 1992). A funcionalidade dessas proteínas na cepa estudada, entretanto, não foi avaliada.

#### 14.3.2 Mobiloma

O percentual ( $\approx 4\%$ ) de genes relacionados a elementos móveis no genoma indica a importância dessas sequências para *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02. As sequências de inserção são normalmente abundantes e diversas no gênero *Acinetobacter*, variando de 0 a 400 IS por genoma. Espécies com genomas de menor tamanho normalmente apresentam um maior número de IS, com destaque para *A. lwoffii*, *A. junii*, *A. parvus* e *A. ursingii* (Touchon *et al.*, 2014). Em um estudo comparativo entre três genomas, *A. baumannii* AYE e SDF e *A. baylyi* ADP1, oriundos de nichos distintos, Vallenet e colaboradores (2008) observaram que a quantidade e os tipos de IS nos três genomas variavam consideravelmente, sendo mais abundantes no genoma da cepa isolada de piolhos de corpo, *A. baumannii* SDF, o menor dos três avaliados.

Assim como *A. baumannii* SDF, *A. parvus* e *A. lwoffii*, *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 possui um genoma pequeno em relação a outros genomas de *Acinetobacter* já sequenciados, porém rico em sequências de inserção. É provável que esses elementos genéticos tenham contribuído para a redução desse genoma, especialmente através de eventos de recombinação e interrupção de genes (Vallenet *et al.*, 2008; Touchon *et al.*, 2014).

Apesar de não portar muitos genes de resistência a antimicrobianos, várias transposases encontradas no genoma de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 estão descritas em plasmídeos encontrados em cepas de *A. baumannii* MDR, alguns carreando

genes de resistência relevantes para a epidemiologia clínica, como *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-24</sub>.

Pouco se sabe sobre fagos temperados infectando *Acinetobacter* spp. Em uma pesquisa feita em 133 genomas sequenciados do gênero *Acinetobacter*, uma média de 2% dos genomas era formado por genes de fagos e apenas 18 (13,5%) genomas não apresentavam profagos. Alguns continham mais de um profago incorporado, com um máximo de seis em um genoma (Touchon *et al.*, 2014). A presença de um profago incompleto, além de diversas outras sequências de proteínas fágicas, no genoma *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 está em concordância com a frequência e distribuição de genes de origem fágica em *Acinetobacter* spp. descrita até o momento (Touchon *et al.*, 2014).

Embora não tenha sido possível montar nenhum plasmídeo completo a partir do sequenciamento do genoma da cepa estudada, vários genes encontrados já foram descritos em plasmídeos de diferentes espécies bacterianas, alguns desses carreadores de determinantes de resistência importantes no ambiente hospitalar, como OXA-58, OXA-24, NDM e KPC. Dentre esses genes estão elementos transponíveis, genes relacionados à transferência de material genético por conjugação, proteínas de replicação de plasmídeo, proteínas de membrana, além de outras proteínas metabólicas. Outras metodologias, no entanto, são necessárias para detecção de plasmídeos.

### 14.3.3 Persistoma

As funções celulares relacionadas a regulação de genes, sinalização celular, dormência e resposta ao estresse são características importantes para a sobrevivência de um micro-organismo em ambientes com baixa disponibilidade de água e nutrientes, como o ar, e estão relacionados à persistência e adaptação desses micro-organismos aos ambientes.

As células de persistência são morfotipos celulares metabolicamente inativos, portanto em estado de dormência, que atingem esse estado sem passar por uma mudança genética. Essas subpopulações, que formam aproximadamente 1% das células na fase estacionária e em biofilme, são tolerantes a antimicrobianos devido à



sua redução na atividade metabólica e, conseqüentemente, nos alvos dos antibióticos. Diferentemente de células resistentes, que crescem na presença de antimicrobianos, as células de persistência não se multiplicam (Wood, Knabel e Kwan, 2013).

Um dos modelos mais estudados de formação de células de persistência é o do desencadeamento do processo por genes de sistemas toxina-antitoxina (TA), uma vez que estes induzem um estado de dormência que permite às células escapar aos efeitos de antimicrobianos (Wood, Knabel e Kwan, 2013).

Os sistemas TA bacterianos são complexos que participam da sobrevivência da célula sob condições de estresse, como privação de aminoácidos, mudanças de temperatura, tratamento antimicrobiano e estresse oxidativo (Van Melderen e Saavedra De Bast, 2009; Yamaguchi, Park e Inouye, 2011). Embora os sistemas TA tenham sido inicialmente descritos pelo seu envolvimento na manutenção de plasmídeos, estudos recentes mostram que esses sistemas estão presentes em diversas bactérias patogênicas (Park, Son e Lee, 2013).

Um estudo comparando os genomas de patógenos especializados, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, e espécies muito semelhantes, porém não frequentemente associadas a infecções (controles), como *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium smegmatis*, mostrou que a espécies patogênicas possuem um número maior de sistemas TA, além de um genoma reduzido, quando comparados aos controles (Georgiades e Raoult, 2010). A observação de nove cassetes de genes de sistemas TA em um genoma pequeno como o de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, um micro-organismo isolado de um ambiente com baixa disponibilidade de nutrientes, evidencia a importância desses sistemas na sua adaptação. Os dados existentes até o momento, no entanto, não são suficientes para permitir o estabelecimento de uma correlação segura entre número de sistemas TA no genoma e estilo de vida ou taxa de crescimento (Van Melderen e Saavedra De Bast, 2009).

Os sistemas TA são divididos nos tipos I a V, de acordo com a natureza da antitoxina, uma vez que a toxina é sempre uma proteína. A antitoxina pode ser um RNA (tipos I e III) ou uma proteína (tipos II, IV e V) (Van Melderen e Saavedra De Bast, 2009; Jurenaite, Markuckas e Suziedeliene, 2013). A maioria dos sistemas TA tipo II tem como alvo a replicação de DNA ou a síntese de proteínas, processos que são extremamente custosos para as células, em termos de consumo de energia.

Sua redução, portanto, seria benéfica para a célula em condições de estresse (Buts *et al.*, 2005; Gerdes, Christensen e Løbner-Olesen, 2005). A relação direta ou indireta entre a formação de células de persistência e os sistemas HipBA, RelBE, MazEF, MqsRA e YafQ/DinJ já foi relatada (Wood, Knabel e Kwan, 2013).

A presença de diversos *loci* de sistemas TA em patógenos de crescimento lento (Pandey e Gerdes, 2005) e a existência de uma associação entre a ativação de toxinas e populações tolerantes a antimicrobianos (Keren *et al.*, 2004; Singh, Barry e Boshoff, 2010) apontam para a grande importância de sistemas TA tipo II cromossomais na fisiologia bacteriana, bem como no ciclo de vida de patógenos que exibem um estágio de dormência e fenótipo de células de persistência no hospedeiro (Gupta, 2009).

Pouco se sabe acerca da ocorrência e distribuição de sistemas TA no gênero *Acinetobacter*, especialmente nas espécies não-*baumannii*. No banco de dados TADB (*Toxin Antitoxin Data Base*; <http://202.120.12.135/TADB2/index.php>) (Shao *et al.*, 2011), criado para organizar as sequências disponíveis de sistemas TA tipo II, está registrada a presença desses sistemas nas cepas de *A. baumannii* ACICU, AYE, ATCC® 17978 e SDF, e em *A. baylyi* ADP1.

Sistemas TA funcionais das famílias MazEF, HigBA, RelBE, HicAC e HipAB já foram descritos em amostras clínicas de *A. baumannii*. Em um estudo, o sistema MazEF foi encontrado em todas as cepas estudadas e o RelBE em aproximadamente 88% das amostras, enquanto o HigBA estava presente em apenas 4,7% (Ghafourian *et al.*, 2014). Outra pesquisa, que analisou a presença de sistemas TA nas sequências de genomas e plasmídeos de *A. baumannii*, relatou um sistema homólogo do HigBA como prevalente (Jurenaite, Markuckas e Suziedeliene, 2013).

O sistema RelBE, encontrado em maior número no genoma de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, é um exemplo do modelo de regulação de crescimento e atua durante a presença de condições de estresse como a privação de aminoácidos, através da regulação do nível global de tradução na célula, de maneira independente de ppGpp. Como consequência, o sistema RelBE induz um estado de dormência da célula até que haja novamente condições favoráveis ao crescimento (Van Melderen e Saavedra De Bast, 2009).

Já o sistema HipBA, representado por dois cassetes gênicos no genoma de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, faz parte do modelo de persistência, o qual permite que

uma pequena fração da população bacteriana entre em um estado de dormência que a torna capaz de sobreviver a diversas condições adversas, notadamente tratamentos antimicrobianos. Ao contrário do sistema RelBE, o HipBA está diretamente envolvido na formação de células de persistência e é capaz de causar o aumento na síntese de ppGpp (Van Melderen e Saavedra De Bast, 2009).

Apesar de esses sistemas TA já terem sido descritos em *Acinetobacter* spp., a sua observação na cepa *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 ajuda a esclarecer a distribuição desses sistemas em espécies ambientais de *Acinetobacter*, em que o desenvolvimento de células de persistência, muitas vezes associada à presença de sistemas TA, pode ser essencial para a sobrevivência no seu nicho.

A ativação dos sistemas TA é geralmente induzida por uma molécula de função reguladora global do metabolismo bacteriano, a alarmona guanosina tetrafosfato (ppGpp), essencial para a formação de células de persistência (Wood, Knabel e Kwan, 2013). A ppGpp comanda a resposta estrigente das células, a qual é produzida através de RelA e SpoT durante situações de estresse e é capaz de mudar a transcrição de determinados genes pela interação direta com a RNA polimerase, além de reduzir diretamente a replicação de DNA e a síntese proteica (Wood, Knabel e Kwan, 2013).

Devido à forte relação entre ppGpp, sistemas TA e células de persistência, o estudo da influência de cada um desses fatores nesse processo se faz interessante (Wood, Knabel e Kwan, 2013), especialmente em cepas isoladas de ambientes com altos níveis de estresse.

A proteína inibidora da divisão celular SulA, identificada na categoria de “Células de persistência” da anotação do RAST, é conservada na maioria das bactérias, entretanto nenhum homólogo foi encontrado em *Acinetobacter* spp. Ao longo do tempo, o gênero *Acinetobacter* divergiu significativamente de outras bactérias do mesmo grupo filogenético, como *Pseudomonas*, de modo que as proteínas de *Acinetobacter* spp. geralmente apresentam diferenças consideráveis em relação às proteínas de outros micro-organismos (Robinson *et al.*, 2010).

A proteína SulA é induzida como parte da resposta SOS em *E. coli*, suspendendo temporariamente a divisão celular em casos de danos ao DNA. A ausência de SulA em *Acinetobacter* spp. indica que os mecanismos de respostas globais ao estresse nesse gênero ainda necessitam ser desvendados (Robinson *et al.*, 2010). Estudos mais aprofundados sobre a homologia entre SulA de outras

espécies bacterianas e a proteína de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02, bem como sobre o seu papel na divisão celular, na resposta ao dano de DNA e na formação de células de persistência seriam importantes para o conhecimento desses mecanismos no gênero. O entendimento desses caminhos metabólicos fundamentais para a célula bacteriana pode revelar potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas.

*Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 pode ser descrita como uma cepa bacteriana de genoma pequeno, que possui diversos genes relacionados à sobrevivência às intempéries ambientais e à competição em seu nicho natural, ainda desconhecido. Alguns desses genes certamente facilitaram a sobrevivência desse micro-organismo em um ambiente exposto a uma alta pressão seletiva de antimicrobianos, como a unidade de tratamento intensivo de um hospital. Embora não seja uma cepa especificamente adaptada ao ambiente hospitalar, a presença de genes de resistência a antimicrobianos e de diversos elementos móveis que facilitam a troca de material genético torna *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 um risco potencial, devido à sua capacidade de atuar como reservatório de genes de resistência, adquirindo e disseminando esses genes.

Atualmente, um novo sequenciamento está em andamento com o objetivo de aumentar a cobertura do genoma e reduzir o número de contigs montados, para fins de publicação. Os dados do novo sequenciamento serão então depositados no banco de dados de genomas do NCBI.

## CONCLUSÕES

- A contagem de colônias microbianas totais nas amostras de ar coletadas em diferentes pontos do CTI Geral do HUPE mostrou variações no período de estudo, possivelmente associadas à limpeza (redução do número de colônias) e a procedimentos realizados nos pacientes no momento da coleta (aumento do número de colônias).
- No total de amostras estudadas, independentemente do ponto de coleta, houve predomínio de BGNNF sendo *P. aeruginosa* (24,64%) e *Acinetobacter* spp (14,01%) os principais representantes.
- No ar, houve predominância de BGNNF não relacionados a IrAS, entretanto houve isolamento de *A. baumannii* MDR portadores dos genes de resistência a carbapenêmicos *bla*<sub>OXA-51</sub> e *bla*<sub>OXA-23</sub>.
- Embora no ar o percentual de enterobactérias tenha sido pequeno, houve isolamento de uma *K. pneumoniae* produtora de KPC e ESBL (TEM, CTX), uma *K. pneumoniae* ESBL positiva (TEM) e uma amostra do Complexo *E. cloacae* ESBL positiva (TEM, CTX).
- Para as superfícies, os percentuais de BGNNF e enterobactérias foram semelhantes. *A. baumannii* e *P. aeruginosa* foram os principais BGNNF isolados de superfícies, com destaque para *A. baumannii* MDR (n=9) isolados de respiradores próximos ao leito e duas *P. aeruginosa* MDR isoladas das pias.
- Em relação às enterobactérias encontradas nas superfícies, *K. pneumoniae* e CEC foram as mais frequentes, com amostras MDR produtoras de KPC e ESBL de ambas as espécies encontradas nas bombas infusoras, carrinho de enfermagem e, especialmente, nas pias.
- A ocorrência de BGN-MDR no ambiente alerta para o potencial de transmissão desses micro-organismos por via aérea e pelo contato com superfícies próximas ao leito. As superfícies foram as principais fontes ambientais de BGN-MDR no CTI Geral do HUPE.

- Dos oito genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos pesquisados, seis foram encontrados nas amostras ambientais, indicando uma variedade nos determinantes de resistência dos BGN presentes na unidade.
- O sequenciamento do genoma da cepa isolada de ar *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 mostrou, além do gene *bla<sub>OXA-58</sub>*, os genes *tetA(39)* e *tetR(39)*, que conferem resistência a tetraciclina, todos “silenciosos”.
- Foram observados diversos genes que participam na resistência a metais pesados no genoma estudado, porém nem todos os genes necessários para um fenótipo de resistência foram encontrados. A cepa foi resistente apenas a arsênico, com uma CIM elevada, a cobre e a zinco.
- Genes relacionados a formação de células de persistência também foram encontrados, indicando que este pode ser um mecanismo de sobrevivência dessa cepa às condições adversas impostas e de adaptação ao ambiente.
- As metodologias de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) e de comparação de genomas (ANI, snpTree) aplicadas indicam que *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 representa uma nova espécie.

## REFERÊNCIAS

Adelowo, OO.; Fagade, OE. The tetracycline resistance gene tet39 is present in both Gram-negative and Gram-positive bacteria from a polluted river, Southwestern Nigeria. *Lett Appl Microbiol*, 48 (2): 167-72, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Nota técnica nº1/2010. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Brasília, 25 de outubro de 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Nota técnica nº1/2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Brasília, 17 de abril de 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº35, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. *Diário Oficial da União* nº58, 18 de ago. 2010. Seção 1, páginas 44-6.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies. Brasília, 2010.

Agersø, Y; Guardabassi, L. Identification of Tet 39, a novel class of tetracycline resistance determinant in *Acinetobacter* spp. of environmental and clinical origin. *J Antimicrob Chemother*, 55 (4): 566-9, 2005.

\_\_\_\_\_; Petersen, A. The tetracycline resistance determinant Tet 39 and the sulphonamide resistance gene *sullI* are common among resistant *Acinetobacter* spp. isolated from integrated fish farms in Thailand. *J Antimicrob Chemother*, 59 (1), 23-7, 2007.

Akinbowale, OL et al. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int J Antimicrob Agents*, 30 (2): 177-82, 2007.

Anantharaman, V; Iyer, LM; Aravind, L. Ter-dependent stress response systems: novel pathways related to metal sensing, production of a nucleoside-like metabolite, and DNA-processing. *Mol Biosyst*, 8 (12): 3142-65, 2012.

Antonio, CS et al. High Prevalence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Carrying the blaOXA-143 Gene in Brazilian Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55: 1322-3, 2011.

Aradská, J et al. Proteomic differences between tellurite-sensitive and tellurite-resistant *E. coli*. *PLoS One*, 8(11): e78010, 2013.

Aziz, RK et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9: 75, 2008.

Baek, I et al. *Burkholderia monticola* sp. nov., isolated from mountain soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65: 504-9, 2015.

Barbosa, Beatriz Godoy Vilela. *Acinetobacter spp.: resistência a antimicrobianos, genotipagem e dinâmica da colonização em CTI de um Hospital Universitário – um ano de estudo*. 2011. 82f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica Humana)-Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Bastos, MD; Coelho, ML; Santos, OC. Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, Publicado *online*. doi:10.1099/mic.0.082289-0. 2014.

Bertini, A et al. Multicopy bla<sub>OXA-58</sub> gene as a source of high-level resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51 (7): 2324-8, 2007.

Boo, TW e Crowley, B. Detection of bla<sub>OXA-58</sub> and bla<sub>OXA-23</sub>-like genes in carbapenem-susceptible *Acinetobacter* clinical isolates: should we be concerned? *J Med Microbiol*. England, 58: 839-41, 2009.

BRASIL. Instrução Normativa Nº52/2007, de 21 de novembro de 2007. Estabelecer a lista de pragas quarentenárias ausentes (A1) e de pragas quarentenárias presentes (A2) para o Brasil. . Brasília, DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil 21 nov. 2007.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria GM/MTE nº 485, de 11 de novembro de 2005– Aprova a Norma Regulamentadora nº 32, que versa sobre a Segurança e Saúde no Trabalho em Estabelecimentos de Saúde. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 nov. 2005.

Buts, L et al. Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem Sci*, 30 (12): 672-9, 2005.

Cai, L; Liu, G et al. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiol*, 9: 4, 2009.

\_\_\_\_\_ Rensing, C et al. Novel gene clusters involved in arsenite oxidation and resistance in two arsenite oxidizers: *Achromobacter* sp. SY8 and *Pseudomonas* sp. TS44. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83 (4): 715-25, 2009.

Callahan, C e Deutscher, MP. Identification and characterization of the *Escherichia coli* rbn gene encoding the tRNA processing enzyme RNase BN. *J Bacteriol*, 178 (24): 7329-32, 1996.



- Carvalho, KR. et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*<sub>OXA-23</sub> collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 34: 25-8, 2009.
- Castro-Nallar, E et al. Concordance and discordance of sequence survey methods for molecular epidemiology. *PeerJ*, 3: e761, 2015.
- Cezário, RC et al. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamases in adults intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(5): 269-74, 2009.
- Chan, JZ et al. Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiol*, 12: 302, 2012.
- Choi, JY et al. *Acinetobacter* species isolates from a range of environments: species survey and observations of antimicrobial resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74: 177-180, 2012.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 9<sup>th</sup>ed. Approved standards M2-A9. Wayne, P.A.; EUA, 2006.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100–S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EUA, 2013.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100–S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EUA, 2014.
- Cosentino, S et al. PathogenFinder--distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. *PLoS One*, 8 (10): e77302, 2013.
- Costa, PS et al. Bacteria and genes involved in arsenic speciation in sediment impacted by long-term gold mining. *PLoS One*, 9 (4): e95655, 2014.
- da Silva, VL et al. Occurrence of multidrug-resistant and toxic-metal tolerant enterococci in fresh feces from urban pigeons in Brazil. *Microbes Environ*, 27 (2): 179-85, 2012.
- Dalben, MF et al. Swab cultures across three different body sites among carriers of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* species: a poor surveillance strategy. *Journal of Hospital Infection*, 74: 395-6, 2009.
- Dalla-Costa, LM et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 3403-6, 2003.

de Sá Cavalcanti, FL et al. Emergence of extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination? *Diagn Microbiol Infect Dis*, 77 (3): 250-1, 2013

Diene, SM et al. The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new "killer bugs" are created because of a sympatric lifestyle. *Mol Biol Evol*, 30 (2): 369-83, 2013.

Dortet, L; Poirel, L; Nordmann, P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int*, 2014: 249856, 2014.

Espinal, P et al. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* group by MALDI-TOF MS. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18: 1097-103, 2012.

Espírito Santo, C; Morais, PV; Grass, G. Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 1341–8, 2010.

Evans, BA et al. Novel genetic context of multiple bla OXA-58 genes in *Acinetobacter* genospecies 3. *J Antimicrob Chemother*, 65 (8): 1586-8, 2010.

Fariñas, MC e Martínez-Martínez, L. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31(6): 402-9, 2013.

Figueiredo, DQ. et al. First report of the bla<sub>OXA-58</sub> gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 106(3): 368-70, 2011.

Fernandez, RC; Weiss, AA. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun*, 62 (11): 4727-38, 1994.

Ferreira, AE et al. Presence of OXA-23 producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in southern Brazil. *Microbial Drug Resistance*, 17: 221-7, 2011.

Fu, Y et al. Characterization of a novel plasmid type and various genetic contexts of bla<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter* spp. from multiple cities in China. *PLoS One*, 9 (1): e84680, 2014.

Georgiades, K e Raoult, D. Defining pathogenic bacterial species in the genomic era. *Front Microbiol*, 1: 151, 2010.

Gerdes, K; Christensen, SK.; Løbner-Olesen, A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol*, 3 (5): 371-82, 2005.

Gianoulli, M et al. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect Dis*, 13: 282-93, 2013.

Girlich, D; Poirel, L; Nordmann, P. First isolation of the *bla*<sub>OXA-23</sub> carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54: 578-9, 2010.

Ghafourian, S et al. The mazEF toxin-antitoxin system as a novel antibacterial target in *Acinetobacter baumannii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 109 (4): 502-5, 2014.

Gordon, NC e Wareham, DW. Mutidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35: 219-26, 2010.

Goris, J et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57: 81-91, 2007.

Grass, G; Rensing, C; Solioz, M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol*, 77 (5): 1541-7, 2011.

Grosso, F et al. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J. Antimicrob. Chemother.*, 66: 62-5, 2011.

Gullberg, E et al. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *MBio*, 5 (5): e01918-14, 2014.

Gundi, VAKB et al. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology*, 155: 2333-41, 2009.

Gupta, A. Killing activity and rescue function of genome-wide toxin-antitoxin loci of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*, 290 (1): 45-53, 2009.

Gusatti, CS et al. First occurrence of *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii* isolated from a clinical sample in southern Brazil. *Braz J of Microbiol.*, 243-6, 2012.

Hasman H et al.  $\beta$ -Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56: 115–21, 2005.

Higgins, PG et al. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolysing class D  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53: 5035-8, 2009.

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

Ho, CH et al. Is the use of low-pressure pulsatile lavage for pressure ulcer management associated with environmental contamination with *Acinetobacter baumannii*? *Arch Phys Med Rehabil*, 90 (10): 1723-6, 2009.

Isokpehi, RD et al. Evaluative profiling of arsenic sensing and regulatory systems in the human microbiome project genomes. *Microbiol Insights*, 7: 25-34, 2014.

Jones, P et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30 (9): 1236-40, 2014.

Jurenaite, M; Markuckas, A; Suziedeliene, E. Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*, 195 (14): 3165-72, 2013.

Kanonenberg, K; Schwarz, CK; Schmitt, L. Type I secretion systems - a story of appendices. *Res Microbiol*, 164 (6): 596-604, 2013.

Keeling, CI et al. Draft genome of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, a major forest pest. *Genome Biol*, 14 (3): R27, 2013.

Kelly, KO; Deutscher, MP. The presence of only one of five exoribonucleases is sufficient to support the growth of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174 (20): 6682-4, 1992.

Keren, I et al. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 186 (24): 8172-80, 2004.

King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med.*; 44: 301-7, 1954.

Koo, JH; Kim, YS. Functional evaluation of the genes involved in malonate decarboxylation by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Eur J Biochem*, 266(2): 683-90, 1999.

La Forgia, C et al. Management of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit using novel environmental disinfection: a 38-month report. *Am J Infect Control*, 28: 259-63, 2010.

Lautenbach, E et al. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: emergence, epidemiology, and impact on clinical and economic outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 31: 47-53, 2010.

Leekitcharoenphon, P et al. snpTree--a web-server to identify and construct SNP trees from whole genome sequence data. *BMC Genomics*, 13 (Suppl 7): S6, 2012.

Livermore, DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med*, 27 (2): 128-42, 2012.

\_\_\_\_\_. Has the era of untreatable infections arrived? *J. Antimicrob. Chemother.*, 64: i29-i36, 2009.

\_\_\_\_\_ e Woodford, N. The  $\beta$ -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, 14: 413-20, 2006.

Lobo, Caroline Zapater. Características microbiológicas e clínicas das infecções por *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* em Unidade de Terapia Intensiva Cardíaca de um Hospital Universitário do Rio de Janeiro. 79f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica Humana)- Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Lopes, BS; Evans, BA; Amyes, SG. Disruption of the bla<sub>OXA-51</sub>-like gene by ISAba16 and activation of the bla<sub>OXA-58</sub> gene leading to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* Ab244. J Antimicrob Chemother, 67 (1): 59-63, 2012.

Macnaughton, S et al. Characterization of metal-resistant soil eubacteria by polymerase chain reaction--denaturing gradient gel electrophoresis with isolation of resistant strains. Can J Microbiol, 45 (2): 116-24, 1999.

Magiorakos, AP et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect., 18: 268-81, 2012.

Manian, FA; Griesnauer, S; Senkel, D. Impact of terminal cleaning and disinfection on isolation of *Acinetobacter baumannii* complex from inanimate surfaces of hospital rooms by quantitative and qualitative methods. Am J Infect Control, 41 (4): 384-5, 2013.

Maragakis, LL e Perl, TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis., 46:1254-63, 2008.

Marchaim, D et al. Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Clinical Microbiology, 45:1551-5, 2007.

Marti, S et al. Characterization of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in an *Acinetobacter* Genospecies 3 clinical isolate. Antimicrob. Agents Chemother., 52: 2955-8, 2008.

Martins, AF et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in southern Brazil. Infection, 37: 474-6, 2009.

Mattner, F et al. Preventing the spread of multidrug-resistant Gram-negative pathogens: Recommendations of an expert panel of the German Society of Hygiene and Microbiology. Dtsch Arztebl Int, 108: 39- 45, 2012.

Mehtar, S; Wiid, I; Todorov, SD. The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and Mycobacterium tuberculosis isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study. J Hosp Infect, 68 (1): 45-51, 2008.

Mendes, RE et al. Codetection of bla<sub>OXA-23</sub>-like gene (bla<sub>OXA-133</sub>) and bla<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter radioresistens*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Antimicrob Agents Chemother, 53 (2): 843-4, 2009.

Merkier, AK et al. Polyclonal spread of bla(OXA-23) and bla(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *J Infect Dev Ctries*, 2 (3): 235-40, 2008.

Miriagou, V et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect*; 16: 112–22, 2010.

Mitchell, A et al. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res*, 2014.

Morgan, DJ et al. Transfer of multidrug-resistant bacteria to healthcare workers' gloves and gowns after patient contact increases with environmental contamination. *Crit Care Med.*, 40: 1045–51, 2012.

Mulvey, MR et al. Characterization of the First Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Salmonella* Isolate Identified in Canada. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 460-2, 2003.

Munoz-Price, LS et al. Aerosolization of *Acinetobacter baumannii* in a trauma ICU\*. *Crit Care Med*, 41 (8): 1915-8, 2013.

Nordmann, P et al. The emerging NDM carbapenemases. *Trends in Microbiol.*, 19: 588-95, 2011.

\_\_\_\_ e Poirel, L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*; 68: 487–9, 2013.

Nunes, ZG et al. Indoor air microbiological evaluation of offices, hospitals, industries, and shopping centers. *Mem do Inst Oswaldo Cruz*, 100: 351-7, 2005.

Nurk, S et al. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol*, 20 (10): 714-37, 2013.

O'Gara, JP; Gomelsky, M; Kaplan, S. Identification and molecular genetic analysis of multiple loci contributing to high-level tellurite resistance in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Appl Environ Microbiol*, 63 (12): 4713-20, 1997.

Ormeño-Orrillo, E et al. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Syst Appl Microbiol*, Publicado *online*. doi:10.1016/j.syapm.2014.12.002. 2014.

Overbeek, R et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res*, 42: D206-14, 2014.

Pagano, M et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. *Int J Antimicrob Agents*, 2015.

Pandey, DP.; Gerdes, K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res*, 33 (3): 966-76, 2005.

Park, SJ; Son, WS; Lee, BJ. Structural overview of toxin-antitoxin systems in infectious bacteria: a target for developing antimicrobial agents. *Biochim Biophys Acta*, 1834 (6): 1155-67, 2013.

Paterson, DL. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis*, 43: S43-8, 2006.

Peleg, AY, Seifert, H; Paterson, DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21: 538-82, 2008.

Perez, F e van Duin, D. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A menace to our most vulnerable patients. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 80: 225-33, 2013.

Poirel, L et al. OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49 (1): 202-8, 2005.

\_\_\_\_\_; Naas, T; Nordmann, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (1): 24-38, 2010.

\_\_\_\_\_ e Nordmann, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 12: 826-36, 2006.

\_\_\_\_\_ e Nordmann, P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene bla<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50 (4): 1442-8, 2006.

\_\_\_\_\_; Potron, A; Nordmann, P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*, 67 (7): 1597-606, 2012.

Ramasamy, D et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64 (Pt 2): 384-91, 2014.

Rang, C et al. Dual role of the MgtC virulence factor in host and non-host environments. *Mol Microbiol*, 63 (2): 605-22, 2007.

Reichert, B et al. *Acinetobacter baylyi* long-term stationary-phase protein StiP is a protease required for normal cell morphology and resistance to tellurite. *Can J Microbiol*, 59 (11): 726-36, 2013.

Richter, M e Rosselló-Móra, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (45): 19126-31, 2009.

Robinson, A et al. Essential biological processes of an emerging pathogen: DNA replication, transcription, and cell division in *Acinetobacter* spp. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74 (2): 273-97, 2010.

Robledo, IE et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54: 1354-7, 2010.

Roca, I et al. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: Commensal hospital dweller turned pan- drug- resistant menace. *Front Microbiol*, 3: 148, 2012.

Saalfeld, SMS et al. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian intensive care unit. *J Hosp Infect.*, 72: 365-8, 2009.

Sanger F, Nicklen S. DNA sequencing with chain-terminating. *Proc. Natl. Acad.*, 74: 5463–7, 1977.

Schimith Bier, KE et al. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. *Am J Infect Control*, 38: 308-14, 2010.

Shao, Y et al. TADB: a web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res*, 39: D606-11, 2011.

Siguiet, P et al. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res*, 34: D32-6, 2006.

Silva, Luciene Ribeiro da Costa. *Perfil de resistência e disseminação clonal de cepas de Acinetobacter spp. em hospitais da cidade do Rio de Janeiro*. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica Humana)- Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio do Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Singh, R; Barry, CE.; Boshoff, HI. The three RelE homologs of *Mycobacterium tuberculosis* have individual, drug-specific effects on bacterial antibiotic tolerance. *J Bacteriol*, 192 (5): 1279-91, Mar 2010.

Spellberg, B e Bonomo, RA. "Airborne assault": a new dimension in *Acinetobacter baumannii* transmission\*. In: (Ed.). *Crit Care Med*. United States, 41: 2042-4, 2013.

Stiefel, U et al. Contamination of hands with meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* after contact with environmental surfaces and after contact with the skin of colonized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 32: 185-7, 2011 *apud* Weber, D.J.; Anderson, D.; Rutala, W. A. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 26(4): 338- 344, 2013.

Stucki, D; Gagneux, S. Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* and the need for a curated database. *Tuberculosis (Edinb)*, 93 (1): 30-9, 2013.

Tang, CS e Wan, GH. Air quality monitoring of the post-operative recovery room and locations surrounding operating theaters in a medical center in Taiwan. *PLoS One*, 8 (4): e61093, 2013.

Taylor, DE et al. Location of a potassium tellurite resistance operon (tehA tehB) within the terminus of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 176 (9): 2740-2, 1994.



\_\_\_\_\_ et al. Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Bacteriol*, 184 (17): 4690-8, 2002.

Touchon, M et al. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biol Evol*, 6 (10): 2866-82, 2014.

Towner, KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect.*, 32: 1-9, 2009.

Tsakris, A et al. Clusters of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones producing different carbapenemases in an intensive care unit. *Clin Microbiol Infect.*, 14: 588-94, 2008.

Turpeinen, R; Kairesalo, T; Häggblom, MM. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. *FEMS Microbiol Ecol*, 47(1): 39-50, 2004.

Turton, JF et al. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: Evidence for emerging species. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 1445-9, 2010.

Vallenet, D et al. Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS One*, 3 (3): e1805, 2008.

van Duin, D et al. Carbapenem- resistant *Enterobacteriaceae*: a review of treatment an outcomes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 75: 115-120, 2013.

Van Melderen, L; Saavedra De Bast, M. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet*, 5 (3): e1000437, 2009.

Vandamme, P e Peeters, C. Time to revisit polyphasic taxonomy. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106 (1): 57-65, 2014.

Villegas, MV et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem- hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51: 1553-5, 2007.

Weber, DJ et al. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care- associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am J Infect Control*, 38: S25-33, 2010.

\_\_\_\_\_; Anderson, D; Rutala, WA. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 26: 338-44, 2013.

Werneck, JS et al. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: case report. *J. Antimicrob. Chemother.*, 66 (2): 452-4, 2011.

Wood, TK; Knabel, SJ; Kwan, BW. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol*, 79 (23): 7116-21, 2013.

Woodford, N et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 27: 351-3, 2006.

Wright, GD. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol*, 13 (5): 589-94, 2010.

Yamaguchi, Y; Park, JH; Inouye, M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Genet*, 45: 61-79, 2011.

Yigit, H et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45: 1151-61, 2001.

Zander, E et al. Worldwide dissemination of acquired carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamases in *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*, 43 (4): 375-7, 2014.

Zankari, E et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*, 67 (11): 2640-4, 2012.

Zarrilli, R et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries.*, 3: 335-41, 2009.

Zavascki, AP et al. Multidrug- resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 8: 71-93, 2010.

Zhao, J et al. Diversity change of microbial communities responding to zinc and arsenic pollution in a river of northeastern China. *J Zhejiang Univ Sci B*, 15 (7): 670-80, 2014.

Zhou, Y et al. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res*, 39: W347-52, 2011.

**APÊNDICE A** – Características gerais dos genomas de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02 e outras cepas de *Acinetobacter* spp. disponíveis no Genbank.

<b>Espécies</b>	<b>Número de acesso</b>	<b>Tamanho (Mp)</b>	<b>GC%</b>	<b>Proteínas</b>	<b>RNAs</b>
<b><i>Acinetobacter</i> sp. 5-2Ac02</b>	<b>Pendente</b>	<b>2,74</b>	<b>41</b>	<b>2.331</b>	<b>43</b>
<b><i>A. towneri</i> DSM14962</b>	GCA_000368785	2,95	41,2	2.635	81
<b><i>A. radioresistens</i> SH164</b>	GCA_000162115	3,15	41,50	2.874	61
<b><i>A. radioresistens</i> SK82</b>	GCA_000175675	3,28	41,50	3.188	63
<b><i>A. Iwoffi</i> SH145</b>	GCA_000162095	3,35	42,60	3.134	64
<b><i>A. junii</i> SH205</b>	GCA_000162075	3,46	38,70	3.186	64
<b><i>A. baumannii</i> SDF</b>	GCA_000069205	3,47	39,13	2.975	87
<b><i>A. baylyi</i> ADP1</b>	GCA_000046845	3,59	40,40	3.307	100
<b><i>A. johnsonii</i> SH046</b>	GCA_000162055	3,69	41,30	3.363	72
<b><i>A. baumannii</i> AB307-0294</b>	GCA_000021145	3,76	39,00	3.451	91
<b><i>A. calcoaceticus</i> PHEA-2</b>	GCA_000191145	3,86	38,80	3.599	75
<b><i>Acinetobacter</i> sp. 6014059</b>	GCA_000163395	3,87	39,00	3.880	58
<b><i>A. baumannii</i> AB900</b>	GCA_000173395	3,91	38,90	3.598	60
<b><i>Acinetobacter</i> sp. RUH2624</b>	GCA_000162375	3,95	38,70	3.693	74
<b><i>Acinetobacter</i> sp. SH024</b>	GCA_000163635	3,97	38,70	3.653	74
<b><i>Acinetobacter</i> sp. 6013150</b>	GCA_000163355	3,98	38,90	3.964	27
<b><i>A. baumannii</i> ACICU</b>	GCA_000018445	3,99	39,00	3.759	82
<b><i>A. baumannii</i> ATCC17978</b>	GCA_000015425	4,00	38,88	3.367	84
<b><i>A. baumannii</i> AYE</b>	GCA_000069245	4,04	39,34	3.712	101
<b><i>A. baumannii</i> AB0057</b>	GCA_000021245	4,05	39,19	3.801	91
<b><i>A. oleivorans</i> DR1</b>	GCA_000196795	4,15	38,70	3.874	89

Fonte: A Autora, 2015

**APÊNDICE B** – Subsistemas e categorias apresentados pela anotação do RAST para sequências codificadoras de proteínas do genoma de *Acinetobacter* sp. 5-2Ac02

Subsistemas	Nº de CDS
<b>Cofatores, Vitaminas, Grupos prostéticos e Pigmentos</b>	<b>140</b>
Biotina	36
Cluster de síntese de Biotina	15
Biossíntese de Biotina	21
Sem subcategoria - Biossíntese de Tiamina	7
Riboflavina, FMN, FAD	26
Riboflavina, FMN and FAD - metabolismo em plantas	13
Riboflavina para FAD	4
Riboflavina, FMN and FAD - metabolismo	9
Piridoxina (Vitamina B6) - Biossíntese	6
NAD e NADP - cofator de biossíntese global	10
Folato and pterinas	47
Cluster de biossíntese de Folato	10
Cofator de biossíntese de Molibdênio	10
Biossíntese de Folato	11
Proteína 5-FCL-like	16
Ácido Lipóico - metabolismo	4
Coenzima A - Cluster de Biossíntese	4
<b>Parede Celular e Cápsula</b>	<b>95</b>
Polissacarídeos capsulares e extracelulares	18
Síntese de dTDP-rhamnose	5
Biossíntese e montagem de polissacarídeos capsulares	6
Glicanos que contêm Ramnose	7
Componentes de Parede Celular de Gram-Negativos	22
Montagem de Lipopolissacarídeos	18
Peptidoglicano lipídeo II flipase	1
Sistema de triagem de Lipoproteínas	3
Sem subcategoria	54
Mureína Hidrolases	9
Biossíntese de Peptidoglicano	29
Biossíntese de UDP-N-acetilmuramato de Frutose-6-fosfato	6
YjeE	4
Reciclagem de Aminoglicosídeos do Peptidoglicano	2
Reciclagem de Aminoácidos do Peptidoglicano	4
Componentes de parede celular de Gram-Positivos: Biossíntese de ácido teicurônico	1
<b>Virulência, Patogenicidade e Defesa</b>	<b>69</b>
Resistência a antibióticos e compostos tóxicos	60
Cobre - Homeostase	13
Resistência a Cobalto-zinco-cádmio	15

Resistência a Arsênico	10
Tolerância ao Cobre	3
Resistência a fluoroquinolonas	4
$\beta$ -lactamase	1
Bombas de efluxo de resistência a múltiplos antimicrobianos	11
Resistência a compostos de crômio	3
Invasão e resistência intracelular	9
Operon de Micobactérias - síntese de proteínas (proteínas ribossomais SSU)	4
Operon de Micobactérias - transcrição de DNA	2
Operon de Micobactérias - síntese de proteínas (proteínas ribossomais LSU)	3
<b>Metabolismo de Potássio - Sem subcategoria</b>	<b>14</b>
Potássio - homeostase	12
Sistema de efluxo de Potássio regulado por Glutathione	2
<b>Variados</b>	<b>30</b>
Projeto Planta-Procaríotos DOE	14
Família de proteínas YrdC-YciO-Sua5	11
Niacina e Colina - transporte e metabolismo	2
Proteínas com domínio Rodanese simples	1
Variados - Sem subcategoria	16
Família de proteínas Fosfoglicerato	4
Dioxigenases	2
Família DedA de proteínas de membrana interna	1
Família de enzimas de lactonização do Muconato	1
Proteínas amplamente distribuídas não incluídas em subsistemas	8
<b>Transporte de membrana</b>	<b>60</b>
Transportadores ABC -Oligopeptídeos	3
Sistema de Secreção de Proteínas tipo VII (via Chaperona/Usher)	3
Translocação de proteínas através da membrana citoplasmática	4
Partícula bacteriana de reconhecimento de sinal (SRP)	1
Sistema de translocação de duas argininas (tat)	3
Sistema de Secreção de Proteínas Tipo I	3
Transportadores de Cátions	6
Transporte de Magnésio	4
Sistema de transporte de Cobre	2
Uni- Sim- e Antiporte	2
Sem subcategoria - Sistemas de transporte Ton e Tol	15
Transportadores TRAP	1
Sistema de Secreção de Proteínas e nucleoproteínas, Tipo IV - Pilus	23
<b>Aquisição e metabolismo do Ferro</b>	<b>1</b>
<b>Metabolismo de RNA</b>	<b>95</b>
Modificação e processamento de RNA	76
Síntese de pseudouridina	7
Poliadenilação bacteriana	4
tRNA nucleotidiltransferase	1
Metiltiottransferases	3
Modificação de tRNA - posição 34	8

Processamento e degradação de RNA	4
Metilação de RNA	17
Biossíntese de Queosina-Arqueosina	15
Biossíntese de mnm5U34	7
Processamento de tRNA	10
Transcrição	18
Iniciação da transcrição, fatores sigma bacterianos	4
RNA polimerase bacteriana	4
Fatores de transcrição bacterianos	10
Sem subcategoria - Group II intron-associated genes	1
<b>Nucleosídeos e Nucleotídeos</b>	<b>45</b>
Pirimidinas - Síntese De Novo	9
Purinas	19
Metabolismo de Xantina em Bactérias	2
Utilização de Purinas	3
Conversão de Purinas	14
Sem subcategorias	4
Redução de Ribonucleotídeos	2
Adenosil nucleosidases	2
Detoxificação	13
Nucleosídeo trifosfato pirofosfohidrolase MazG	1
Proteínas Nudix (nucleosídeo trifosfato hidrolases)	9
<i>Housecleaning</i> Nucleosídeo trifosfato pirofosfatases	3
<b>Metabolismo de Proteínas</b>	<b>147</b>
Dobramento de proteínas	27
GroEL GroES	5
Proteínas chaperonas	9
Intercâmbio periplasmático de dissulfídeo	5
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	8
Selenoproteína O	1
Biossíntese de Proteínas	82
Aminoacilação de tRNA	26
Ribossomo SSU bacteriano	22
Modulação da atividade ribossomal	1
Biogênese ribossomal	12
<i>Frameshift</i> programado	2
Fatores bacterianos de terminação da Tradução	11
Fatores bacterianos de alongamento da Tradução	5
Família G de Fatores de alongamento da tradução	1
Glicil-tRNA sintetase	2
Processamento e modificação de proteínas	19
Lisilação do Fator P de alongamento da tradução	3
Biossíntese de Lipoproteínas	4
Peptidase sinalizadora	3
Proteína ribossomal S12p Asp metiltiotransferase	3
Família G3E de GTPases com P-loop	2

Peptídeo metionina sulfóxido redutase	4
Degradação protéica	18
Aminopeptidases	2
Degradação protéica	3
Metalocarboxipeptidases	2
Proteólise dependente de ATP em bactérias	11
<b>Divisão celular e Ciclo celular</b>	<b>28</b>
Sem subcategoria	28
YgjD e YeaZ	2
Operon de síntese macromolecular	6
Citoesqueleto bacteriano	18
Formação de septo intracelular em Enterobactérias	2
<b>Regulação e sinalização celular</b>	<b>59</b>
Sem subcategoria	39
Sinalização cAMP em bactérias	10
Proteínas da família LysR em <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	3
Proteínas da família LysR em <i>Escherichia coli</i>	6
Proteínas reguladoras órfãs	6
Proteínas reguladoras ligantes de DNA, estáticas	1
Enzimas reguladas por Zinco	10
Resposta estrigente, metabolismo de (p)ppGpp	3
Regulação da Virulência - Sistema regulatório de dois componentes BarA-UvrY (SirA)	6
Morte celular programada e Sistemas Toxina- Antitoxina	14
Regulação de mureína hidrolase e morte celular	4
Sistemas Toxina- Antitoxina de estabilização de <i>replicons</i>	10
<b>Metabolismo de DNA (124)</b>	<b>124</b>
Reparo de DNA	56
Uracil-DNA glicosilase	3
Sistema MutL-MutS	2
Sistema UvrABC	3
Fotoliase bacteriana	1
2-fosfoglicolato selvagem	4
RecA e RecX	2
Sistema que inclui RecA, MutS e uma proteína hipotética	3
Reparo de DNA, bacteriano	17
Via RecFOR de reparo de DNA	8
Reparo de DNA por Excisão de bases	9
Reparo de DNA, UvrD bacteriano e helicases relacionadas	4
CRISPs - CRISPRs	5
Sem subcategorias	50
Restrição-ModificaçãoTipo I	21
Sistema de Restrição-Modificação	22
YcfH	2
Proteínas estruturais do DNA	5
Replicação de DNA	5

DNA topoisomerases, Tipo I, independentes de ATP	1
DNA topoisomerases, Tipo II, dependentes de ATP	4
Recombinação de DNA - RuvABC	3
Captção de DNA, competência - Cluster de processamento de DNA	5
<b>Ácidos Graxos, Lipídeos e Isoprenóides</b>	<b>82</b>
Fosfolipídeos	26
Síntese de Cardiolipina	2
Metabolismo de Glicerolipídeos e Glicerolfosfolipídeos em bactérias	24
Triacilgliceróis - Metabolismo	4
Ácidos Graxos	13
Cluster de metabolismo de Ácidos Graxos	10
Acil-CoA tioesterase II	3
Sem subcategoria- metabolismo de Polihidroxiturato	15
Isoprenóides	24
Isoprenóides para Quinonas	3
Biossíntese de Isoprenóides	14
Ramo de biossíntese de Isoprenóides independente de mevalonato	7
<b>Metabolismo de Nitrogênio - Sem subcategoria</b>	<b>15</b>
Hidrólise do Cianato	2
Estresse nitrosativo	1
Assimilação de amônia	12
<b>Dormência e Esporulação - Sem subcategoria</b>	<b>2</b>
Células de Persistência	1
Proteínas associadas à esporulação, com funções mais abrangentes	1
<b>Respiração</b>	<b>66</b>
Biotina	36
Reaçõesceptoras de elétrons	19
Citocromo d ubiquinol oxidases terminais	2
Citocromo O ubiquinol oxidases terminais	4
Redutases da respiração anaeróbica	7
Citocromo oxidases terminais	6
Reações doadoras de elétrons	36
Complexo respiratório I	14
Dehidrogenases respiratórias 1	3
Succinato dehidrogenase	5
NADH ubiquinone oxidoreductase	14
Sem subcategoria	11
Família de Quinona oxidoreductase	2
Biogênese de citocromo c oxidases	3
Biogênese de citocromo tipo c	3
Citocromos solúveis e carreadores de elétrons relacionados	3
<b>Resposta ao estresse</b>	<b>72</b>
Estresse oxidativo	31
Proteção de Espécies reativas de oxigênio	2
Estresse oxidativo	7
Glutaciona: Biossíntese e ciclo gama-glutamil	2



---

Glutathiona: Reações não- redox	7
Rubreritrina	3
Regulação de processos nucleares Redox- dependente	5
Glutathiona: Ciclo redox	3
Glutarredoxinas	2
Proteínas de choque frio, família CspA	2
<i>Cluster</i> extendido dnaK de proteínas de choque térmico	15
Detoxificação	21
Aquisição de selenato e selenito	2
Resistência a telurito: determinantes cromossomais	1
Detoxificação de formaldeído dependente de glutathiona	5
Sem subcategoria	13
Flavohemoglobina	1
Família de proteínas de estresse univesal	1
Regulação de resposta ao estresse SigmaB	2
Hemoglobinas bacterianas	3
<i>Operon</i> Hfl	2
Privação de Carbono	4
Resposta ao estresse periplasmático	3
<b>Metabolismo de compostos aromáticos</b>	<b>16</b>
Via periférica de catabolismo de compostos aromáticos	12
Degradação de Quinato	1
Degradação de Benzoato	7
Via de degradação cloroaromática	4
Metabolismo de intermediários aromáticos centrais - Catabolismo de Salicilato e gentisato	1
Sem subcategoria - Degradação de Gentisato	3
<b>Aminoácidos e derivados</b>	<b>193</b>
Glutamina, glutamato, aspartato, asparagina - assimilação de amônia	13
Glutamina, glutamato, aspartato, asparagina - Biossíntese	11
Glutamate dehidrogenase	1
Glutamina sintetase	1
Metabolismo de Histidina - Biossíntese	9
Arginina: ciclo de uréia, poliaminas	20
Lisina, treonina, metionina e cisteína	68
Degradação de Metionina	4
Biossíntese de Metionina	19
Biossíntese de Treonina e Homoserina	10
Via DAP de biossíntese de Lisina	20
Biossíntese de Cisteína	15
Poliaminas - Produção de DAP (1,3-diaminopropano)	2
Aminoácidos aromáticos e derivados	44
Via comum de sínteses de compostos aromáticos	8
Síntese de Corismato	11
Corismato: Intermediário para síntese de triptofano, antibióticos PAPA e mais	12
Ramos de Fenilalanina e Tirosina a partir do Corismato	4

---

Síntese de Triptofano	9
Prolina e 4-hidroxiprolina	7
Síntese de Prolina	5
Proteína hipotética relacionada ao metabolismo de Prolina	2
Alanina, serina e glicina	30
Biossíntese de Glicina, Alanina e Serina	20
Utilização de Glicina e Serina	10
<b>Metabolismo de aminoácidos sulfurados</b>	<b>31</b>
Assimilação inorgânica	23
Sem subcategoria	8
Tiorredoxina-dissulfídeo redutase	7
Metabolismo de Galactosilceramida e Sulfatídeo	1
<b>Metabolismo do Fósforo- Sem subcategoria</b>	<b>35</b>
Transportador de fosfato de alta afinidade e controle do Regulon PHO	9
Metabolismo de Fosfato	24
Polifosfato	2
<b>Carboidratos</b>	<b>126</b>
Metabolismo central de carboidratos	69
Metabolismo de Metilglioxal	9
Metabolismo de Piruvato II: acetyl-CoA, acetogênese a partir de piruvato	10
Interconversões Piruvato - Alanina - Serina	5
Glicólise e Gliconeogênese	9
Complexos de Dehidrogenases	8
Ciclo TCA	13
Via de Pentose fosfato	4
Metabolismo de Piruvato I: reações anapleróticas, PEP	6
Interconversões Glicolato - Glioxilato	5
Di- e oligossacarídeos - Utilização de Lactose	1
Metabolismo de um-carbono (por tetrahidropterinas)	5
Ácidos orgânicos	6
Ciclo de Metilcitrato	4
Utilização de Lactato	2
Fermentação	36
Biossíntese de Butanol	8
Fermentações: ácidos mistos	6
Subunidades de Acetolactato sintase	2
Fermentação de Acetyl-CoA a Butirato	12
Metabolismo de Acetoína e butanediol	8
Aquisição e utilização de Glicerol e Glicerol-3-fosfato	5
Sem subcategorias - Regulador de armazenamento de Carbono	1
Monossacarídeos - Utilização de D-ribose	3

Fonte: A Autora, 2015