Anna Karina Queiroz Mostachio

**Caracterização de carbapenemases e proteínas de membrana externa
de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos isolados de
sangue**

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

Programa de: Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo

2010

Anna Karina Queiroz Mostachio

**Caracterização de carbapenemases e proteínas de membrana externa
de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos isolados de
sangue**

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

Programa de: Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mostachio, Anna Karina Queiroz

Caracterização de carbapenemases e proteínas de membrana externa de
Acinetobacter spp. resistentes aos carbapenêmicos isolados de sangue / Anna
Karina Queiroz Mostachio. -- São Paulo, 2010.

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.*Acinetobacter* 2.Resistência microbiana a medicamentos
3.Carbapenemos 4.Porinas

USP/FM/DBD-225/10

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Anail e Valdomiro, pelo
o incentivo e amor que guiaram o meu caminho.

Ao Marcel,
Que sempre nas horas mais difíceis esteve ao meu lado. Meu crescimento
como pessoa é graças a você.
Muito, muito, muito....

AGRADECIMENTOS

A Dra. Silvia Figueiredo Costa, pela orientação, apoio e amizade e acima de tudo, por toda a dedicação prestada a cada etapa deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Investigação Médica (LIM-54) do Hospital das Clínicas de São Paulo, pelo apoio e colaboração deste trabalho.

Aos amigos Inneke van der Heijden, Liang Fung, Andréia Alcaia, Jorge Paez e Renata Pacheco pelo incentivo e apoio nos momentos mais difíceis.

A Jessika Zerbini, companheira de trabalho, pela colaboração prestada neste trabalho.

A Dra Ana Gales e Dra Elsa Mamizuka pelo apoio e colaboração, e pelas sugestões propostas no exame de qualificação.

A Jussara do Laboratório de Investigação Médica (LIM-10), pelo grande auxílio prestado.

A Mônica Aguilar e Patrícia Neves, pelo grande auxílio prestado para execução deste trabalho.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
2. Objetivos	20
3. Métodos	21
4. Resultados.....	41
Discussão	63
Conclusões	79
Anexo.....	107

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Condições de corrida de PFGE	27
Tabela 2 - Critérios interpretativos para análise de tipagem molecular	27
Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR	33
Tabela 4 - Distribuição dos isolados em relação às concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos imipenem e meropenem	42
Tabela 5 - Relação entre as concentrações inibitórias mínimas (CIM), tipo de oxacilinase encontrada por PCR multiplex, tipagem molecular por PFGE e unidade clínica de internação e data de isolamento da cepa	44
Tabela 6 - Relação entre os perfis de sensibilidade para imipenem (IMP) e os perfis moleculares gerados por PFGE	45
Tabela 7 - Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) distribuídos de acordo com a Carbapenemase detectada por PCR	48
Tabela 8 - Relação entre os perfis de sensibilidade para Imipenem (IMP) e Meropenem (MERO) e os perfis encontrados pela PCR multiplex para a detecção de genes de oxacilinas e das Metallo- β -lactamases	50
Tabela 9 - Relação entre as concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos imipenem e meropenem e a presença do gene <i>ISAba1</i> adjacente ao gene codificador da enzima <i>Oxa-23-like</i>	51
Tabela 10 – Avaliação de duas técnicas fenotípicas para a detecção da produção de Metallo- β -lactamase por aproximação de disco em comparação com a metodologia de padrão ouro – PCR	54
Tabela 11 - Resultados do teste de hidrólise do Imipenem de diferentes <i>clusters</i> gerados pela PFGE.	55
Tabela 12 - Resultados do teste de Hodge modificado	56
Tabela 13 - Resultados do teste de Hodge modificado para os quais foram realizados testes de hidrólise	57
Tabela 14 - Resultados do poder inibitório do NaCl sobre as enzimas oxacilinas, teste de Hodge e hidrólise do imipenem para isolados com a presença do gene codificador para a enzima Oxa-23.	58
Tabela 15 - Avaliação das proteínas de membrana externa de 26 isolados de <i>Acinetobacter</i> sp resistentes aos antibióticos carbapenêmicos quando comparadas com isolado sensível (ATCC 19606)	60

Lista de figuras

Figura 1 - Gráfico ilustrativo da distribuição dos isolados de <i>Acinetobacter</i> no período dos anos de 2002 a 2004 no HC-FMUSP	42
Figura 2 - Representação do perfil de bandas obtido a partir do método de eletroforese em campo pulsado, utilizando-se a enzima de restrição <i>Sma</i> I em amostras de <i>Acinetobacter</i> spp.....	45
Figura 3 – Foto de gel de eletroforese – PCR Multiplex para detecção dos genes de oxacilinas e metalo- β -lactamases de isolados de <i>Acinetobacter</i> spp	47
Figura 4 – Foto de gel com resultados da Reação de Amplificação em cadeia da Polimerase para detecção do gene <i>ISAba-1</i> em isolados de <i>Acinetobacter</i> spp	49
Figura 5 - Reação de amplificação em cadeia da polimerase para detecção do gene <i>ISAba-1</i> adjacente ao gene codificador da enzima <i>Oxa-23-like</i> em isolados de <i>Acinetobacter</i> spp.....	51
Figura 6 - Determinação da concentração inibitória mínima e detecção de Metalo- β -lactamase por fita de Etest® com EDTA de uma amostra clínica de <i>Acinetobacter</i> spp.....	53
Figura 7 – Foto de Gel de SDS-PAGE de proteínas da membrana externa de isolados de <i>Acinetobacter</i> spp	61
Figura 8 – Foto de gel de reação de amplificação em cadeia da polimerase para a identificação do gene da proteína de membrana externa de 33-36kDa de isolados de <i>Acinetobacter</i> spp	62

Lista de Abreviaturas

ABM - Ácido Beta-mercaptoetanol

CAZ - Ceftazidima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CD – Disco Combinado

DDST – Teste do Duplo Disco Sinergismo

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ESBL – Beta Lactamase de Espectro Estendido

et. al – e outros

ICS – Infecção de Corrente Sanguínea

ISAb_a – Seqüência de Inserção *Acinetobacter baumannii*

MβL – Metallo- β- lactamase

OMP – Proteína de Membrana Externa

PBP – Proteínas Ligadoras de Penicilinas

PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

SCN – *Staphylococcus* Catalase Negativa

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

RESUMO

MOSTACHIO, A K Q. Caracterização de carbapenemases e proteínas de membrana externa de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos isolados de sangue. São Paulo, 2010. Dissertação de mestrado, Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Acinetobacter spp é um dos mais freqüentes agentes de infecções nosocomiais nos hospitais brasileiros. Vários surtos hospitalares causados por *Acinetobacter* resistente aos carbapenêmicos já foram descritos no Brasil. O presente estudo verificou a presença de alteração de proteínas da membrana externa e produção de carbapenemases em cepas de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos isoladas de corrente sanguínea de pacientes internados no HC-FMUSP. Os isolados foram identificados pelo método miniaturizado API20NE. As concentrações inibitórias mínimas dos carbapenêmicos foram realizadas através da técnica de microdiluição em caldo. As carbapenemases foram estudadas através de testes fenotípicos, detecção dos genes foi realizada pela reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento e hidrólise de imipenem. As proteínas de membrana externa foram caracterizadas através da técnica de SDS-Page e PCR. A tipagem molecular foi realizada usando a técnica de eletroforese em campo pulsado. Noventa e oito por cento dos isolados apresentaram genes codificadores da enzima Oxa-51-like, sendo que a única amostra que não apresentou essa enzima, após sequenciamento do gene codificador da porção 16S do RNA ribossomal, foi considerada da espécie *A. calcoaceticus*. A presença do gene *bla*_{oxa-51-like} não foi encontrada adjacente a sequência ISAb_a1. Em dezoito por cento do total das amostras foi detectada pela reação de PCR o gene *bla*_{oxa-51-like/oxa-23-like}, sendo que sete desses isolados pertenciam ao mesmo clone. Somente em um isolado não foi detectada a presença do grupamento ISAb_a-1 adjacente ao gene codificador da enzima Oxa-23. Dessas amostras apenas uma hidrolisou o antimicrobiano imipenem. Cinco isolados apresentaram o gene *bla*_{imp} (IMP-1 pelo sequenciamento). Apenas dois desses isolados se mostraram capazes de hidrolisar imipenem e através da inibição com o EDTA confirmou-se a presença da produção de enzimas Metallo- β -lactamase. Vários testes fenotípicos foram utilizados para a detecção de carbapenemase como DDST, CD e Etest. Quando comparados com a PCR (metodologia “padrão-ouro”), os melhores resultados foram observados com a aproximação de disco de imipenem (10 μ g) com um disco contendo 3 μ L do ácido β -mercaptoetanol não diluído (sensibilidade de 100% e especificidade de 71%). Observou-se que na maioria dos isolados, as proteínas de membrana externa analisadas estavam diminuídas ou ausentes. Três isolados apresentaram ausência dessas proteínas, suas CIM variaram de 32

a 128µg/mL e de 64 a 256µg/mL para o imipenem e meropenem respectivamente. O presente estudo verificou que a resistência aos carbapenêmicos está relacionada à presença de carbapenemases e alterações de membrana externa. Além disso, a importância das carbapenemases como principal mecanismo de resistência em isolados de *Acinetobacter* deve ser melhor investigada, já que esses genes podem não estar sendo expressos.

Palavras chaves: *Acinetobacter*, Resistência microbiana a medicamentos, Carbapenêmicos, Porinas

SUMMARY

MOSTACHIO, A K Q. Characterization of carbapenemase and outer membrane proteins of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from blood. São Paulo, 2010. Dissertation of the masters, Program of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Medicine, University of São Paulo.

Acinetobacter spp is an important etiologic agent causing nosocomial infection in Brazilian hospitals. Carbapenem resistance among this agent has been increasing in the last decade, and several outbreaks due to resistant *Acinetobacter* had been identified in Brazil. This study verified the presence of altered outer membrane proteins and production of carbapenemase in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. strains isolated from bloodstream infections of patients hospitalized in the HC-FMUSP.

This study verified the presence of altered outer membrane proteins and production of carbapenemase in *Acinetobacter* spp. carbapenem-resistant strains isolated from bloodstream of patients hospitalized in the HC-FMUSP.

The isolates were identified by miniaturized method API20NE and the minimal inhibitory concentration of carbapenem was performed by broth microdilution. Carbapenemases were studied by phenotypic screening tests, detection of its genes coded by amplification polymerase chain reaction (PCR), sequence and imipenem hydrolysis. The proteins of external membrane were studied by SDS-PAGE and PCR. Molecular typing was performed using the technique of pulsed field gel electrophoresis. About 98% of these isolates were positive for genes encoding the enzyme Oxa-51-like, only one strain did not exhibit this enzyme. After sequencing of the gene encoding portion 16S ribosomal RNA this strain was considered the species *A. calcoaceticus*. The presence of the sequence adjacent ISAb₁ was not found in none of these isolates with the gene bla_{OXA-51-like}. Eighteen percent of the total of strains demonstrated by PCR the gene bla_{oxa-51-like/oxa-23-like}. Seven of these strains belonged to the same clone. Only one isolate did not show the presence of ISAb₁ adjacent to the gene encoding Oxa-23. Only one of this strain hydrolyzed imipenem. Five isolates had the gene bla_{imp}, (IMP-1 by sequencing). Two of these isolates had proved capable of hydrolyzing the antibiotic imipenem and the inhibition with EDTA confirmed the presence of MBL-producing enzymes. Several phenotypic tests were used to screening of carbapenemase as DDST, CD and Etest. When compared with PCR, the gold standard, the best results were seen with the next disk of imipenem (10 mg) with another disk containing 3µL acid β-mercaptoethanol pure (100% sensitivity and specificity 71%). In most isolates the outer membrane proteins were decreased or absent. Three isolate showed total absence of these proteins, their MIC ranged from 32 to 64 to 128µg/mL and 256µg/mL to imipenem and meropenem respectively. This study has shown that carbapenem resistance was linked to the presence of carbapenemases and

alteration of the outer membrane. Moreover, the significance of carbapenemase as the main mechanism of resistance in isolates of *Acinetobacter* should be better investigated, since these genes might not be cast.

Keywords: *Acinetobacter*, Drug resistance microbial, Carbapenems, Porin

1. INTRODUÇÃO

***Acinetobacter* spp.**

Acinetobacter spp. é um cocobacilo gram-negativo, aeróbio estrito, oxidase negativa e não móvel da família da *Moraxellaceae* (Schreckenberger *et al.*, 2003).

Sua taxonomia ainda não está bem definida, até a atualidade já foram descritas 32 geno-espécies de *Acinetobacter* spp. com base na seqüência do DNA, destas 19 possuem nomes propostos (Quadro 1) (Murray *et al.*, 2009; Nemec, 2009).

Acinetobacter spp é um patógeno predominantemente hospitalar. A maioria das doenças nosocomiais está relacionada ao complexo *A. calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, grupos 3 e 13TU), sendo *A. baumannii* a espécie de maior importância clínica (Giamarellou *et al.*, 2008; Peleg *et al.*, 2008; Joly-Guillou, 2005; Bergogne-Bérézin e Towner, 1996).

Quadro 1. Nomes propostos para as espécies de *Acinetobacter*

GENERO/ESPECIE	ANO DA DISCRIÇÃO NA LITERATURA
<i>Acinetobacter spp</i>	1954
<i>A. baumannii</i>	1986
<i>A. baylyi</i>	2003
<i>A. beijerinckii</i>	2009
<i>A. bouvetii</i>	2003
<i>A. calcoaceticus</i>	1911
<i>A. gernerii</i>	2003
<i>A. grimontii</i>	2003
<i>A. gyllenbergii</i>	2009
<i>A. haemolyticus</i>	1963
<i>A. johnsonii</i>	1986
<i>A. junii</i>	1986
<i>A. lwoffii</i>	1940
<i>A. parvus</i>	2003
<i>A. radioresistens</i>	1988
<i>A. schindleri</i>	2001
<i>A. tandoii</i>	2003
<i>A. tjernbergiae</i>	2003
<i>A. towneri</i>	2003
<i>A. ursingii</i>	2001

Fonte: adaptado de Murray *et al.* Critical Care Clinics 2009; 24:237-48

O gênero *Acinetobacter* é um grupo que apresenta grande similaridade fenotípica, o que dificulta a identificação laboratorial das diferentes espécies. Tradicionalmente, as tecnologias de hibridização do DNA e de seqüenciamento genético são os melhores métodos para diferenciar as espécies deste gênero (Bergogne-Bérézin e Towner, 1996).

Dois estudos compararam o sistema fenotípico miniaturizado de identificação API20NE e a identificação genotípica de hibridização com DNA, e mostraram pouca correlação entre os dois métodos, principalmente na separação entre as espécies do grupamento *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* (Bergogne-Bérézin e Towner, 1996).

A metodologia de identificação fenotípica, proposta por Bouvet e Grimont em 1986, utiliza 28 testes, essa metodologia foi modificada pelo

mesmo autor em 1987 e conseguiu diferenciar 11 das 12 geno-espécies de *Acinetobacter* inicialmente descritas, mas parece não diferenciar todas as geno-espécies atualmente descritas (Peleg *et al.*, 2008, Gerner-Smidt *et al.*, 1991).

Epidemiologia

Nos últimos anos tem sido observado o aumento das infecções por *A. baumannii* pelo mundo todo, especialmente nas unidades de terapia intensiva (UTI) e nas unidades de queimados (Siroy *et al.*, 2005).

Dados do sistema National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) entre os anos de 1975 e 2003, mostram aumento significativo das infecções causadas por *Acinetobacter* spp nos hospitais americanos. Esse relato evidenciou aumento de 1,5% para 6,9% das pneumonias hospitalares, 1,8% para 2,4% das infecções de corrente sanguínea, 0,5% para 2,1% das infecções de sítios cirúrgicos e um aumento de 0,6% para 1,6% das infecções de trato urinário causadas por este agente (Slama, 2008).

Em um estudo espanhol de 2008, do qual participaram 246 hospitais, Asensio e colaboradores observaram uma prevalência das infecções por *A. baumannii* de 3 por 1.000 pacientes. Do total de 1.168 infecções causadas por este agente, 24% eram infecções do trato respiratório e 34,5% do total eram cepas resistentes aos carbapenêmicos.

No Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* foram responsáveis por 15% dos casos de

infecções por corrente sanguínea (ICS) primária, de 1993 a 1994 (Levin *et al.*, 1999).

Em estudo realizado no período de 5 anos de 1999 a 2003 nas UTIs do Instituto Central do Hospital das Clínicas, Girão e colaboradores. (2008), identificaram 1.121 ICS hospitalares em 1.004 pacientes, com 1.286 microrganismos isolados. Estes autores evidenciaram predomínio de bacilos Gram-negativos (49%) como causadores das ICS hospitalares, com aumento da sua incidência no período ($p=0,04$). *S. aureus* (24,4%) foi o agente etiológico mais freqüente das ICS, seguido de *A. baumannii* (19,2%) e *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) (11,3%). Dentre os casos analisados de pacientes com identificação positiva para *A. baumannii*, 39% (97/246) foram a óbito em 14 dias ou menos de internação.

De julho de 2006 a junho de 2007, 76 hospitais brasileiros de 21 estados notificaram a ocorrência de infecção de corrente sanguínea (ICS) em UTIs para Rede de Monitoramento de Resistência Microbiana da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Entre as 2.453 ICS notificadas, 29% corresponderam a SCN, 19% a *S. aureus*, 14% a *K. pneumoniae* e 11% a *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (Rede RM-ANVISA/MS CGLAB/MS OPAS/OMS, 2008)

Essa emergência de infecções causadas por *Acinetobacter* é decorrente de vários fatores, dentre eles é possível destacar a resistência intrínseca desse microorganismo a vários antibióticos, assim como a sua habilidade em acumular mecanismos de resistência por intermédio de transposons, plasmídios ou seqüências de inserção.

Os problemas relacionados à resistência antimicrobiana em *Acinetobacter baumannii* parecem ser mais importantes no Brasil e em outros países da América Latina quando comparados com outras regiões do mundo (Reinert *et al.*, 2007). Estudos mostram que a prevalência de isolados resistentes aos carbapenêmicos no Brasil varia de 6 a 11% (Sader *et al.*, 2001, Sader *et al.*, 2005).

Em 1993, foi relatado um surto nas unidades de terapia intensiva, no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, ocasionado por um mesmo clone de *Acinetobacter baumannii* multirresistente, sensível apenas as polimixinas (Levin *et al.*, 1996). Desde então, a infecção por *Acinetobacter baumannii* multirresistente tornou-se endêmica no Instituto Central do HC-FMUSP.

Estudo de Sader e colaboradores do programa SENTRY, no período de 1997 a 1999, verificaram em uma amostragem de 137 isolados de *Acinetobacter* spp., percentagem de resistência de 9,5% e de 8% para os antimicrobianos imipenem e meropenem, respectivamente.

Fatores de risco associados com infecções causadas por *Acinetobacter*

Diferentes infecções nosocomiais são causadas por *Acinetobacter baumannii*, dentre elas pode-se citar: infecção de corrente sanguínea, pneumonia, infecção do trato urinário e meningite (Murray *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2007; Jeon *et al.*, 2005).

Na prática clínica, as infecções por *Acinetobacter* spp. são influenciadas por vários fatores de risco como o uso de dispositivos médicos, a exposição a antibióticos de largo espectro, o tipo de unidade onde o paciente é admitido, e o tempo de internação. A soma destes fatores pode contribuir para surtos que são de difícil controle (Fontana *et al.*, 2008).

Em revisão sistemática de fatores de risco associados com infecção por *Acinetobacter* multirresistente, Falagas e colaboradores (2006), reuniram 20 estudos publicados entre setembro de 1985 e setembro de 2005. Nesta revisão o uso prévio de antibióticos foi o fator de risco mais comumente encontrado, sendo que os carbapenêmicos e as cefalosporinas de terceira geração foram os antibióticos mais empregados. O segundo fator de risco mais prevalente foi o uso de ventilação mecânica.

Em um estudo de coorte conduzido por Cisneros e colaboradores (2005), o maior risco de adquirir infecção por *A. baumannii* esteve relacionado ao tempo de internação dos pacientes, seguido de uso de terapia antimicrobiana prévia.

Mecanismo de resistência

Diferentes mecanismos de resistência do *Acinetobacter* spp. aos β -lactâmicos têm sido reportados, dentre eles a alteração do sítio alvo devido à alteração das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), degradação da droga pela produção de β -lactamases, alteração da permeabilidade da membrana externa dos gram-negativos e efluxo do antimicrobiano (Pitout *et al.*, 1997, Koneman *et al.*, 2001; Livermore *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2003).

Geralmente quando a concentração inibitória mínima dos antimicrobianos é bastante elevada, vários mecanismos de resistência estão envolvidos.

Alteração da membrana externa

Nos Gram-negativos, a membrana externa é a primeira barreira contra a entrada de compostos tóxicos. Essa camada é composta externamente por lipopolissacarídeos e a face interna por fosfolipídios. Moléculas de proteínas de estrutura trimérica cruzam a estrutura interna da membrana externa, essas proteínas, denominadas proteínas de membrana externa (OMPs) ou porinas, formam canais de transporte que permitem a difusão de substâncias hidrofílicas e pequenos nutrientes, podendo esse transporte ser seletivo ou não seletivo (Vila *et al.*, 2007).

Muitos antibióticos, inclusive os β -lactâmicos, podem utilizar esses canais para acessar o periplasma. A entrada dos antibióticos através da membrana externa depende das propriedades das OMPs (número e tamanho) e das características físico-químicas dos antibióticos (Ishi e Nakae, 1993).

Peculiarmente, isolados de *Acinetobacter spp* têm permeabilidade diminuída quando comparados aos demais Gram-negativos. A permeabilidade da sua membrana externa equivale a aproximadamente 3% da permeabilidade da *E. coli* (Quale, 2003) e quando comparada com a permeabilidade aos β -lactâmicos de *P. aeruginosa* pode ser de 2 a 7 vezes menor. Essa baixa permeabilidade explica em parte, a resistência desse microorganismo a vários antibióticos (Vila, 2002).

Alterações da membrana externa decorrentes da diminuição de proteína de 33 a 36 kDa foram mostradas por Costa e colaboradores (2000), esses isolados apresentavam resistência para imipenem e meropenem. Em 2002, Limansky e colaboradores associaram a diminuição da proteína de 29kDa, denominada CarO, em isolados clínicos de *Acinetobacter* com a resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos. Outra proteína associada com a passagem dos antimicrobianos carbapenêmicos pela membrana externa é a proteína de 43kDa (homóloga a OprD de *P. aeruginosa*), essa porina parece estar ligada com a entrada do imipenem ao interior da célula (Clark *et al.*, 1996; Limansky *et al.*, 2002; Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003; Vila *et al.*, 2007).

Produção de enzimas β -Lactamase

Dentre os mecanismos de resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos destaca-se também a produção de enzimas, as β -lactamases, que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, impossibilitando assim, a atividade dessa classe de antimicrobianos. De acordo com Bush e colaboradores (1995), as β -lactamases podem ser divididas em quatro grupos:

Quadro 2- Classificação de β -lactamases segundo Bush *et al.*, 2001

<i>B</i> -Lactamases				
Grupo	Subgrupos	Classe	Características	Representantes
Funcional	maiores	molecular		
1		C	Enzimas produzidas por gram-negativos, usualmente cromossômicas. Conferem resistência a todos <i>B</i> -lactâmicos, exceto aos carbapenems. Não são inibidas por ácido clavulânico.	MR-1, ACT-1, FOX
2			São inibidas na presença do ácido clavulânico	
	2a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência as penicilinas	Penicilinas de gram-positivas
	2b	A	<i>B</i> -lactamases de amplo espectro de bactérias gram-negativas	TEM-1, SHV-1
	2be	A	<i>B</i> -lactamases de espectro estendido, conferem resistência aos monobactams e cefalosporinas de terceira geração	ESBLs
	2br	A	Apresentam reduzida ligação aos inibidores de <i>B</i> -lactamases, algumas ainda mantêm-se suscetíveis ao tazobactam	Enzimas derivadas da TEM e SHV
	2c	A	Inativam carbenicilina	PSE
	2d	D	Enzimas fracamente inibidas pelos inibidores de <i>B</i> -lactamases. Inativam a cloxacilina, possuem pequeno efeito contra carbenicilina	Oxacilinas
	2e	A	Cefalosporinas que podem hidrolizar os monobactams e são inibidas pelo ácido clavulânico	
	2f	A	Carbapenemases. Possuem no seu sítio alvo uma serina. São inibidas pelo ácido clavulânico	Sme
3	3a,3b,3c	B	Enzimas zinco-dependentes que conferem resistência aos carbapenems e outros <i>B</i> -lactâmicos, mas não hidrolizam os monobactams. Essas enzimas são inibidas por EDTA	metalo-beta-lactamases
4			Penicilinas não sequenciadas. Não são inibidas pelo ácido clavulânico	

Fonte: Adaptado de Bush, 2001

Carbapenemases

São denominadas carbapenemases as β -lactamases com capacidade de hidrolisar principalmente os antimicrobianos carbapenêmicos, mas isso não significa que essas enzimas não sejam capazes de hidrolisar outros β -lactâmicos. Outra característica dessas enzimas é que elas não são inibidas pela maioria dos inibidores de β -lactamases (Queenan e Bush, 2007).

Através das suas características essas enzimas podem ser divididas em dois grupos: aquelas que possuem em seu sítio alvo um grupamento serino e aquelas que possuem em seu sítio alvo um átomo de zinco. Elas podem ser encontradas em dois grupos no esquema de Bush e colaboradores: grupo 2f e grupo 3 (Queenan e Bush, 2007).

Oxacilinases

Oxacilinases são carbapenemases do grupo 2f da classificação de Bush, essas enzimas estão presentes em algumas cepas de *Acinetobacter* spp e inativam preferencialmente os antimicrobianos carbapenêmicos e algumas cefalosporinas, como cefepima, porém não atuam na ceftazidima (Bou *et al.*, 2000; Heritier *et al.*, 2005; Jeon *et al.*, 2005; Pournaras *et al.*, 2006). E não parecem ser induzidas pela presença de antibióticos, como o imipenem (Walther-Rasmussen, 2006, Hérítier *et al.*, 2005).

Já foram descritas 121 variantes dessa classe, essas variantes se apresentam divididas em oito grupos, sendo que quatro desses grupamentos enzimáticos já foram identificados em cepas de *Acinetobacter* spp: OXA 23-like, OXA 24-like, OXA 51-like e OXA 58-like (Brown *et al.*, 2005; Walther-

Rasmussen *et al.*, 2006; Woodford *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2008). Os membros de cada grupo compartilham mais de 95% de genes homólogos entre si (Brown *et al.*, 2006).

No ano de 2009 foi relatada na França uma nova classe ou variante de oxacilinase, designada Oxa-143. Essa nova classe ou variante possui uma similaridade de 88% com a seqüência de aminoácidos da Oxa-40, 63% de similaridade com a Oxa-23 e 52% de similaridade com a Oxa-58 (Higgins *et al.*, 2009).

Alguns autores têm demonstrado a associação da presença de oxacilinase de tipo 51 à espécie *Acinetobacter baumannii*, e que juntamente com as integrases de classe 1, parecem ser um poderoso marcador para a detecção dessa espécie (Turton *et al.*, 2006; Feizabadi *et al.*, 2008).

As oxacilinasas, quando isoladas, parecem ter uma pequena capacidade de reduzir a sensibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos, mas quando associada a outros mecanismos de resistência (efluxo, redução da permeabilidade da membrana externa, outras β -lactamases), a seqüências de inserção, ou mesmo uma associação entre diferentes classes de oxacilinasas, as concentrações inibitórias mínimas, tanto para o imipenem quanto para o meropenem, podem ter aumentos significativos (Lu *et al.*, 2009; Feizabadi *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2007).

As oxacilinasas quando associadas às seqüências de inserção, como ISAb_a1, podem ser hiperproduzidas. Essas seqüências de inserção funcionam como um promotor dos genes *bla*_{Oxa-51-like} e *bla*_{Oxa-23-like} quando esses se localizam logo após dessa seqüência, resultando em uma

exagerada expressão desses genes (Ruiz et al, 2007). Essa mesma associação também foi descrita entre *bla*_{oxa 23} e IS*Aba*-4 e entre *bla*_{oxa 58} e IS*Aba*-3. Nenhum elemento móvel foi associado até o momento ao gene *bla*_{oxa40}, pertencente ao grupo Oxa 24-like (Cuzon et al.,2008, Walther-Rasmussen e Hoiby, 2006). Além disso, elas podem conter em sua estrutura transposases, possibilitando a mobilidade desses genes (Peleg et al., 2008).

No Brasil, somente as oxacilinases do grupo Oxa 23-like foram descritas até o momento (Martins et al.,2009; Dalla-Costa et al.,2003).

Metalo- β -Lactamases

Metalo- β -Lactamases (M β L) estão agrupadas no grupo 3 da classificação de Bush, possuem maior eficiência em hidrolisar os antimicrobianos carbapenêmicos quando comparadas as oxacilinases. Além disso, são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, mas não possuem ação contra o aztreonam. São resistentes a ação da maioria dos inibidores de β -lactamases (Queenan e Bush, 2007; Livermore, 2002). Essas enzimas necessitam de zinco em seu sítio alvo para exercer sua função hidrolítica, por isso, perdem a sua atividade na presença do EDTA, um quelante de zinco e outros cátions bivalentes (Queenan e Bush, 2007).

Pela classificação de Bush, essas enzimas podem ser divididas em 3 subgrupos: o subgrupo 3a, que inclui as M β L com amplo espectro de atividade, o subgrupo 3b, que compreende as enzimas que hidrolisam preferencialmente os antimicrobianos carbapenêmicos e o subgrupo 3c,

composto pelas enzimas que hidrolisam fracamente os antimicrobianos carbapenêmicos (Rasmussem e Bush, 1997).

Vários estudos caracterizaram os genes de M β L dentro de integrons, tanto da classe 1 como da classe 3. Esses integrons, quando localizados em transposons ou plasmídios, são responsáveis por transmitir esses genes para varias espécies (Sacha *et al.*, 2008; Juan *et al.*, 2008; Shibata *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2003).

Várias metalo- β -lactamases já foram descritas em *Acinetobacter* spp., dentre elas as mais encontradas são IMP-1 e VIM. Em 2005, uma nova classe de M β L foi descrita em *Acinetobacter baumannii*. Essa enzima, SIM-1, possui menor capacidade de hidrólise frente aos antimicrobianos carbapenêmicos quando comparada a outras classes de M β L, como IMP e VIM (Qi, 2008). Entretanto, SPM uma metalo- β -lactamase descrita em cepas brasileiras de *P. aeruginosa* nunca foi identificada em *Acinetobacter* spp (Gales *et al.*, 2003; Giamarellou *et al.*, 2008).

Isolados de *Acinetobacter* spp. produtores de metalo- β -lactamase já foram descritos em surtos em hospitais brasileiros e em estudos utilizando banco de cepas (Gonçalves *et al.*, 2000., Dalla-Costa *et al.*, 2003; Von Dolinger *et al.*, 2005).

Costa e colaboradores. (2000), estudaram isolados de *A. baumannii* sensíveis e resistentes do mesmo paciente e mostraram que a produção de β -lactamase foi encontrada em todos isolados e que as cepas resistentes apresentavam uma β -lactamase com pl de 6.7 que não estava presente nas cepas sensíveis.

O primeiro relato de um isolado de *A. baumannii* produtor de IMP observado no Brasil ocorreu em um hospital de ensino. O isolado A3227 foi obtido da secreção traqueal quantitativa de um paciente, que desenvolveu pneumonia nosocomial durante sua hospitalização no hospital São Paulo (Gales *et al.*, 2003).

Outras enzimas β -Lactamase

Outras enzimas também descritas em *Acinetobacter* spp. são as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) que conferem resistência as cefalosporinas de terceira e quarta geração e monobactam. Essas enzimas apresentam em sua estrutura um grupamento serino no seu sítio alvo. (Bush *et al.*, 1995).

As ESBLs foram descritas inicialmente em *Klebsiella pneumoniae* e em *Escherichia coli*, mas na atualidade encontram-se disseminadas para as demais espécies de enterobactérias, assim como em *Acinetobacter* (Bradford, 2001). Sua prevalência nesse gênero ainda é incerta, devido à dificuldade da detecção laboratorial pela presença de cefalosporinases, especialmente a enzima AmpC (Peleg *et al.*, 2009).

Várias ESBLs como PER-1, PER-2, VEB-1, CTX-M-2, SHV, TEM-92 e SCO-1 já foram identificadas em surtos de infecção hospitalar causados por isolados de *Acinetobacter* multiresistentes em diferentes partes do mundo (Vahaboglu *et al.*, 2001; Poirel *et al.*, 2003; Celenza *et al.*, 2006; Endimiani *et al.* 2007; Poirel *et al.*, 2007). No entanto, nenhuma dessas enzimas parece ter o poder de hidrolisar os antimicrobianos

carbapenêmicos, com exceção da enzima SCO-1, identificada inicialmente na Argentina. Os isolados com a presença do gene *bla*_{SCO-1} geralmente são resistentes às penicilinas, mas também suscetibilidade diminuída a ceftazidima e ao imipenem (Poirel *et al.*, 2007).

Em 2009, Moubareck e colaboradores identificaram uma nova β -lactamase do grupo GES em *A. baumannii*. Essa nova enzima foi denominada GES-11 e confere resistência aos β -Lactâmicos, inclusive ao aztreonam e ainda possui reduzida sensibilidade para os carbapenêmicos. Apesar de essa enzima já ter sido descrita em outros gêneros de Gram negativos, até essa publicação não havia sido relatada em *Acinetobacter*.

Outra carbapenemase da Classe A de Ambler, a KPC, foi identificada em *Acinetobacter sp.* no final do ano de 2009 em Porto Rico. Esse estudo além de relatar os primeiros casos de KPC nesta espécie, descreveu uma nova variante dessa enzima denominada KPC-10 (Robledo *et al.*, 2009).

Alteração de PBPs

O sítio de ação dos β -lactâmicos é uma enzima denominada proteína ligadora de penicilina (PBP) presente na membrana citoplasmática (Buijs *et al.*, 2008) das bactérias. As PBPs podem ser alteradas por mutações, passando a apresentar baixa afinidade de ligação aos β -lactâmicos, ou levar a produção de PBPs suplementares que passam a apresentar baixa afinidade por esta classe de antimicrobianos (Livermore *et al.*, 1991).

Cada antimicrobiano β -lactâmico possui uma maior afinidade com uma determinada PBP (Buijs *et al.*, 2008). Siroy e seus colaboradores em 2006

descreveram que a PBP1 possui afinidade com algumas cefalosporinas e também com imipenem e que os beta-lactâmicos cefoxetina, cefepima e em menor escala o imipenem possuem afinidade também com a PBP6. Este estudo comparou um isolado sensível de *Acinetobacter* (ATCC 19606) com isolado de *Acinetobacter* resistente a carbapenêmico, através de uma análise combinatória das metodologias de SDS-PAGE, eletroforese em duas dimensões e espectrofotometria de massa evidenciando que o isolado resistente apresentava níveis mais baixos de PBP1b quando comparado com o isolado sensível. Já outro estudo realizado por Yang e colaboradores no ano de 1995 mostrou que os carbapenêmicos possuem uma maior afinidade de ligação com a PBP2.

Alguns autores mostraram que a resistência do *Acinetobacter baumannii* aos antimicrobianos carbapenêmicos também pode estar associada com a diminuição da expressão de PBP2 (Gehrlein *et al.*, 1991; Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003; Giamarellou *et al.*, 2008). A perda da PBP2a estaria relacionada à resistência de baixo nível (CIM de 4mg/l) e a perda da PBP2b com níveis mais altos de resistência (8-32mg/l) (Vila *et al.*, 2002).

Efluxo

Outro mecanismo de resistência identificado em isolados de *Acinetobacter* é uma hiper expressão de bombas de efluxo. O mecanismo de efluxo é expresso em todas as células vivas e tem a função de protegê-las de componentes tóxicos. O aumento da expressão desse mecanismo tem sido associado a bactérias multiresistentes (Vila *et al.*, 2007).

Esse mecanismo pode ser encontrado tanto em bactérias gram-negativas como em gram-positivas, sendo mais complexo em gram-negativos devido à diversidade do envelope celular dessas bactérias. O sistema de expulsão necessita de gasto de energia pela bactéria, mas não ocasiona nenhuma alteração ou mesmo degradação da droga (Kumar e Schweizer, 2005).

Atualmente já foram descritas 6 famílias de sistema de efluxo: (1) Major facilitator superfamily (MFS); (2) Adenosine triphosphate-binding cassette superfamily (ABC); (3) Small Multidrug resistente (SMR); (4) Resistance-nodulation-cell division superfamily (RND); (5) Multidrug and toxic compound extrusion family (MATE); (6) Drug/metabolite transporter superfamily (DMT)

O primeiro sistema descrito em *Acinetobacter spp.* foi o complexo AdeABC, esse complexo pertencente à família RND e confere resistência a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, cefotaxima, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, trimetopim e tigeciclina (Magnet *et al.*, 2001; Peleg *et al.*, 2007). Esse sistema de efluxo é regulado por outro sistema denominado AdeRS (Marchand *et al.*, 2004).

Chau e colaboradores, 2004, descreveram o sistema AdeDE, esse complexo também pertence à família RND e difere do anterior por ser responsável pela diminuição da sensibilidade também a amicacina, ceftazidima, rifampicina e meropenem. Ainda não foi identificada a proteína de membrana externa responsável pela saída do antibiótico.

Um segundo sistema de efluxo AbeM, pertencente à família MATE, também foi caracterizado em *Acinetobacter*. Os substratos para essa bomba

de efluxo incluem os antibióticos gentamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, norfloxacin e trimetoprim (Bratu *et al.*, 2008; Vila *et al.*, 2007).

Em 2006 Chu e colaboradores descreveram em *Acinetobacter* o sistema denominado AdeXYZ, mas a sua correlação com resistência ainda não está bem elucidada.

Outro sistema de bomba de efluxo AdeIJK foi descrito recentemente em *Acinetobacter* por Damier-Piolle e colaboradores (2008). Esse sistema foi classificado como da família dos RND e parece contribuir para a resistência intrínseca do *Acinetobacter* spp as drogas β -lactâmicas, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, fluoroquinolonas, novabiocina, rifampicina.

Alguns autores, entretanto, através de métodos indiretos questionam a importância do efluxo como mecanismo de resistência do *Acinetobacter* spp aos antimicrobianos carbapenêmicos (Bou *et al* 2000; Heritier *et al.*, 2005; Pournaras *et al.*, 2006).

Justificativa do Estudo

Acinetobacter spp é um dos mais freqüentes agentes de infecções nosocomiais nos hospitais brasileiros. A resistência deste agente aos carbapenêmicos vêm aumentando na última década, e vários surtos hospitalares causados por *Acinetobacter* resistente aos carbapenêmicos já foram descritos no Brasil. Os mecanismos de resistência dos isolados de *A. baumannii* aos carbapenêmicos ainda não foram completamente elucidados. A melhor caracterização desses mecanismos pode ser útil no controle da disseminação da resistência desse agente.

2. OBJETIVOS

Estudar alteração das proteínas de membrana externa e produção de carbapenemases de isolados de *Acinetobacter* spp. de infecções de corrente sanguínea resistentes aos carbapenêmicos com diferentes concentrações inibitórias mínimas.

3. MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas

Foram avaliadas 50 cepas de *Acinetobacter* spp resistentes aos antimicrobianos carbapenêmicos obtidas do banco de cepas do LIM54 e isoladas de hemoculturas de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas período de junho de 2002 a dezembro de 2004, dessas amostras 22 (44%) tiveram a sua origem em unidades de terapia intensiva, 18 (36%) de enfermaria e 5 (10%) do Instituto do Coração (INCOR). Essas cepas foram escolhidas aleatoriamente de um total de 150 isolados.

A reidentificação dos isolados foi realizada pelo método manual API20 NE (bioMérieux, França), com leitura de 24 e 48 horas.

Critério de seleção: foram selecionados isolados de *Acinetobacter* spp com diferentes concentrações inibitórias mínimas para imipenem (CIM de 16-256ug/ml) e meropenem (CIM 16-256ug/ml).

3.2 Resistência Bacteriana

3.2.1 Microdiluição em caldo

As cepas resistentes ao imipenem tiveram suas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) determinadas pelo método de microdiluição em caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (MHCA), conforme normas padronizadas pelo CLSI (M7-A5, 2005).

Controle de Qualidade: De acordo com os critérios do CLSI, foram utilizados como cepas controle *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E.coli* ATCC 25922.

Para determinação da CIM pelo método da microdiluição em caldo os seguintes passos foram seguidos:

Preparo da solução estoque do antimicrobiano: O antimicrobiano a ser testado deverá conter em seu rótulo as seguintes informações: número do lote, prazo de validade e a potência expressa em UI/mg ou µg/mg. Para calcular a quantidade necessária do antimicrobiano a ser utilizada, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potência (}\mu\text{g/mg)}}$$

Foi utilizado o solvente apropriado para cada antimicrobiano (CLSI, M100-S12, 2005). A concentração final da solução estoque foi de 10.000 µg/mL.

Número de diluições: As concentrações que foram testadas seguiram os cortes descritos nas tabelas do documento M100-S12 (para uso com M7-A5, CIM) do CLSI, normalmente de 256 µg/mL a 0,125 µg/mL. Para obter a solução de 256 µg/mL, a solução estoque com concentração igual a 10.000 µg/mL. A partir da solução estoque, foram realizadas diluições do antimicrobiano com o diluente adequado (CLSI, M100-S12, 2005), até obter uma diluição de 256 µg/mL.

Preparo das diluições na placa: 50 μ L de meio de cultura CMHCA (Caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado) foi colocado em todos os pocinhos da placa, exceto na coluna 1. 100 μ L da diluição a 256 μ g/mL foi colocado em todos os pocinhos da coluna 1. Com uma pipeta multicanal, foi realizada diluição seriada do antimicrobiano pipetando 50 μ L do primeiro pocinho da linha A (A1) para o segundo pocinho da linha A (A2). Homogeneizar bem com a pipeta e em seguida pipetar 50 μ L do pocinho A2 para o A3. Este procedimento foi realizado até o pocinho A11, deixando o pocinho A 11 com volume final de 100 μ L, o qual foi designado como controle de esterilidade (não se deve acrescentar células bacterianas neste poço, pois permite verificar a ocorrência de contaminação durante a diluição do antimicrobiano). O último pocinho de cada linha (A12 – H12) foi utilizado como controle de crescimento bacteriano, ou seja, 50 μ L de meio de cultura MCHA + 50 μ L de suspensão bacteriana (diluída 1:100).

Preparo da suspensão bacteriana: Foi preparado uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($1,8 \times 10^8$ UFC/mL) por espectrofotometria e diluída esta suspensão 1:100 em solução fisiológica ou MHCA ($1,8 \times 10^6$ UFC/mL).

Inoculação da suspensão bacteriana: adicionado 50 μ L desta solução diluída nos poços 1 a 10 e no poço 12 de todas as colunas (A a H). Após o preparo das diluições, foi realizada inoculação nos poços dentro de 30 minutos. A concentração final da suspensão foi de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Após semeadura, as placas foram homogeneizadas sobre a bancada em movimento rotatório. Foi colocado sob as placas um papel de

filtro estéril umedecido com água destilada estéril ou um saco plástico estéril e incubado as placas a 35°C por 16 a 20 horas, atmosfera ambiente (CLSI, M100-S12, 2005).

Leitura dos CIMs: a leitura das placas foi realizada em local iluminado ou com auxílio de uma luminária ou de um espelho para leitura das placas. O CIM foi determinado de acordo com a observação de crescimento bacteriano nos pocinhos e através de um leitor de ELISA, utilizando um comprimento de onda de 450 nm (o controle de esterilidade será o BRANCO do teste).

3.10 Tipagem Molecular

Protocolo para caracterização molecular por PFGE

A tipagem molecular foi realizada pela técnica de eletroforese de campo pulsado, de acordo com os protocolos descritos por Kaufmann (1998) e Ridley (1998).

Preparo da suspensão bacteriana: as amostras foram repicadas para meio Agar Sangue (AS) de carneiro 5% ou meio TSA, incubadas por 18-24h a 37°C. Três a cinco colônias do crescimento em AS para tubos contendo 3mL TSB e incubadas a 37°C, *overnight*. Os microtubos foram pesados e identificados, e transferido o crescimento do caldo TSB para os respectivos microtubos. Os microtubos foram centrifugados por 20 minutos a 11.000 rpm. Foi retirado o sobrenadante e adicionado 1mL de solução fisiológica estéril ao sedimento. O sedimento foi homogeneizado e transferido para tubos previamente pesados e identificados. Esses tubos foram centrifugados por 20 min, a 11.000 rpm e 4°C. Retirado o sobrenadante foram realizadas

duas lavagens com solução fisiológica estéril. Após a última lavagem, foi retirado totalmente o sobrenadante e pesado o microtubo com o sedimento bacteriano. A massa bacteriana obtida foi calculada e preparada uma suspensão de bactéria na concentração de 100µg/µL em EDTA 25mM pH8,0.

Preparo dos blocos de agarose: o banho-maria (BM) foi ajustado para temperatura de 56°C. Após a fundição da agarose *low melting* (2% em TBE 0,5X) esta foi deixada no BM 56°C. Os microtubos foram identificados com os números das amostras e foi adicionado 300µL de tampão TEM. A esse tampão foram adicionados 5µL da suspensão bacteriana a 100µg/µL. Os microtubos foram homogeneizados e colocados no banho-maria a 56°C. Foi adicionado 30µL de Lisozima 20mg/mL. E após, foi adicionado 340µL de agarose e homogeneizado. Essa mistura foi distribuída em moldes e deixada por 30 minutos a 4°C.

Etapas de extração do DNA bacteriano: foram distribuídos 2mL de tampão EC nos pocinhos de uma placa de cultura de células (24 pocinhos). Os bloquinhos de agarose foram removidos dos moldes e colocados nos pocinhos contendo tampão EC. Foram incubados por 5h a 37°C, sob agitação suave. O tampão EC foi retirado e aos pocinhos foram adicionado 2,0mL de tampão CHEF-TE. Retirado o tampão CHEF-TE e novamente adicionado 2,0mL deste tampão. Foi deixado a temperatura ambiente, sob agitação suave, por 30 minutos. E após, retirado o tampão CHEF-TE. Os bloquinhos foram cobertos com 2mL de tampão ES e foi adicionado 100µL de proteinase K 20mg/mL por pocinho e homogeneizado. Foi realizada uma

incubação a 50°C overnight. Retirado o tampão ES e foram realizadas 5 lavagens com 2,0mL de tampão CHEF-TE. Na primeira lavagem não tem incubação e as demais foram feitas em intervalos de 1 hora. Após a última lavagem, o tampão CHEF-TE foi trocado e a placa foi guardada sob refrigeração.

Etapas de restrição enzimática: foram adicionados 300µL de tampão DNS nos pocinhos que foram usados, em uma placa de cultura de célula (96 pocinhos). Com auxílio de uma espátula e bisturi, o bloquinho de agarose foi pego e cortado ao meio. Os pedaços foram colocados no pocinho contendo DNS. Retirado o tampão DNS, foram realizadas 5 lavagens com tampão DNS, com incubações de 1 hora por lavagem. Retirado o tampão DNS e substituí-lo com 200µL de tampão da enzima (sem enzima). Incubado a 5°C por 1 hora. Removido o tampão da enzima e adicionado tampão da enzima com a enzima de restrição (10U por amostra). Incubado a 5°C por 1 a 2h. Foi retirado da geladeira e incubado nas condições indicadas pelo fabricante, por um período de 15 horas. As enzimas de restrição usadas neste estudo foram *SmaI* para cepas de *Acinetobacter sp*.

Preparo do gel: Agarose 1% em TBE 0,5X (para o pente de 15 amostras preparar 100mL). Foram aplicados bloquinhos no gel, cuidando para não deixar bolhas de ar. Vedados com agarose 1% em TBE 0,5X. Foram preparados 2 litros de TBE 0,5X e acrescentado 200µL de tiouréia 0,5M. Esse volume de TBE com tiouréia foi colocado na cuba e ajustado às condições de corrida de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 1 - Condições de corrida de PFGE para o microorganismo *Acinetobacter* spp.

Microorganismo	Agarose (%)	Switch Time inicial-final	Volts/cm	Tempo de corrida	Separação dos fragmentos em Kb
<i>Acinetobacter</i> spp	1,0	5,0-30,0	6,0	23hs	<50-350

Interpretação dos resultados

Os perfis moleculares foram analisados visualmente, seguindo os critérios de Tenover *et al.* (1997).

Tabela 2 - Critérios interpretativos para análise de tipagem molecular

Interpretação microbiológica baseada nos resultados de tipagem	Número de diferenças genéticas comparadas com um determinado isolado	Número de fragmentos diferentes comparados ao padrão de determinado isolado	Correlação epidemiológica
Indistinguíveis	0	0	Isolado faz parte do surto
Estreitamente relacionados	1	2-3	Isolado provavelmente faz parte do surto
Possivelmente relacionados	2	4-6	Isolado possivelmente faz parte do surto
Diferentes	3	≥ 7	Isolado não faz parte do surto

3.3 Detecção de Metallo- β -lactamase pelo método do Etest® (AB Biodisk (North América Inc., N.J.):

Preparação e padronização do inóculo: uma suspensão bacteriana foi preparada a partir de uma placa com crescimento bacteriano de 18 a 24

horas, na escala 0,5 de McFarland e comparada com uma escala de turvação padrão. A suspensão bacteriana também pode ser quantificada pela densidade óptica em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 625 nm, onde a escala 0,5 de McFarland corresponde à densidade óptica de 0,08 a 0,1 ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Inoculação da placa de meio de cultura: para o Etest[®] foi utilizado o agar Mueller-Hinton, conforme documento do CLSI (M7-A5, 2002). O procedimento foi igual aquele realizado no método de difusão do disco.

Aplicação das fitas de Etest: foram utilizadas fitas de Etest[®] para MBL, onde uma extremidade contém imipenem (IP) e na outra extremidade contém imipenem associado com EDTA (IPI).

Incubação do teste: as placas foram incubadas a 35°C por 16 a 18 horas, em posição invertida (lado do ágar para cima).

Leitura da CIM: após 16 a 18 horas, verificou se o crescimento sobre o ágar estava confluyente e uniforme, com zonas de inibição elípticas.

O CIM a partir de observação através da utilização de luz direta e não refletida.

Interpretação dos resultados: a sensibilidade foi determinada de acordo com os critérios propostos por Walsh *et al.* (2002).

3.4 Detecção de Metallo- β -lactamase pelo método de Arakawa et. al (2000) modificado (Teste do duplo disco sinergismo –DDST- e Disco combinado - CD).

Preparação e padronização do inóculo: foi preparada uma suspensão bacteriana, a partir de uma placa com crescimento bacteriano de 18 a 24 horas, na escala 0,5 de McFarland e comparado com uma escala de turvação padrão. A suspensão bacteriana também foi quantificada pela densidade óptica em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 625 nm, onde a escala 0,5 de McFarland corresponde à densidade óptica de 0,08 a 0,1 ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Inoculação da placa de meio de cultura: foi utilizado o agar Mueller-Hinton, conforme documento do CLSI (M7-A5, 2002). O procedimento é igual aquele realizado no método de difusão do disco.

Aplicação dos discos de sensibilidade: três discos de ceftazidima (CAZ) 30 μ g foram colocados nas placas. A distância entre os discos foi de 4 cm e dois discos filtros foram colocados próximos de um dos discos de ceftazidima. Com uma distância de centro para centro de 2 cm. Em um dos discos foram inoculados 3 μ L do ácido β -mercaptoetanol não diluído e no outro disco foi inoculado 5 μ L de EDTA 0,5M pH 8,0

Em outra placa de Mueller-Hinton foram colocados três discos de imipenem de 10 μ g com distância de 4cm entre si. Com uma distância de 2cm de centros de dois dos discos de imipenem foram colocados dois discos filtros onde foi inoculado num dos discos 3 μ L do β -mercaptoetanol e no outro 5 μ L

de EDTA 0,5M pH 8,0. Outro disco de imipenem foi colocado na placa com uma distancia de 4cm para um dos discos de imipenem e foi acrescentado 4 μ L de EDTA 0,5M pH 8,0.

Incubação do teste: as placas foram incubadas a 35° C por 16 a 18 horas, em posição invertida (lado do agar para cima).

Leitura de zona de inibição: após 16 a 18 horas foi verificado se o crescimento sobre o agar foi confluyente e uniforme, com zonas de inibição circulares. A medição do diâmetro da zona de inibição em milímetros foi feita usando luz direta e não refletida.

Interpretação dos resultados: os halos de inibição foram interpretados de acordo com os critérios propostos por Arakawa *et. al* (2000).

3.5 Detecção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL)

Preparação e padronização do inóculo: foi preparada uma suspensão bacteriana, a partir de uma placa com crescimento bacteriano de 18 a 24 horas, na escala 0,5 de McFarland e comparada com uma escala de turvação padrão. A suspensão bacteriana também foi quantificada pela densidade óptica em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 625 nm, onde a escala 0,5 de McFarland corresponde a D.O de 0,08 a 0,1 ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Inoculação da placa de meio de cultura: o meio de cultura utilizado foi o agar Mueller-Hinton, conforme documento do CLSI (M7-A5, 2002). O procedimento é igual aquele realizado no método de difusão do disco. Também foi utilizado o meio de cultura agar Mueller-Hinton acrescido de 200 μ g de cloxacilina sódica.

Aplicação dos discos: foram utilizados os discos aztreonan (30µg), ceftriaxona (30µg), ceftazidima (30µg), cefotaxima (30µg) colocados 2,5 cm (de borda a borda) ao redor do disco de amoxicilina-clavulanato (30µg).

Incubação do teste: as placas foram incubadas a 35°C por 18 a 24 horas, em posição invertida (lado do agar para cima).

Interpretação dos resultados: a presença da zona de inibição em ao menos uma droga caracteriza a produção de ESBL.

3.7 Detecção de genes codificadores para β -lactamase

3.7.1 Extração de DNA

Foi realizada pelo GenoCIMPrep™ and Tissue DNA Isolation Kit – Amersham Pharmacia Biotech, através do procedimento E (extração de DNA de bactérias Gram-negativas).

3.7.3 Reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de genes de resistência

As reações de PCR foram realizadas para a detecção de carbapenemases e outros mecanismos de resistência.

A detecção dos genes codificadores para metalo- β -lactamases (M β L) e oxacilinases foi realizada através de uma reação de PCR multiplex. A padronização dessa reação foi realizada nas seguintes condições de amplificação: desnaturação 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos. A

etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos (Mostachio *et.al.*, 2009).

Para a detecção do gene codificador da proteína de membrana externa de peso de 33 e 36 kDa, foi utilizado como base o locus AJ831523 descrito no “The Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Balst.cgi>), Del Mar *et al*, 2005 para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores, que foram obtidos através do programa OligoPerfect™Designer (<http://www.invitrogen.com>).

As detecções dos demais genes de resistência foram realizadas de acordo com os critérios propostos pelas respectivas referências destacadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR

Mecanismo de resistência	Gene	Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores (5'-3')	Tamanho do Amplicon (pb)	Referência
Carbapenemase M β L	<i>bla</i> _{IMP}	GAATAGAATGGCTTAACTCTC CCAAACCACTAGGTTATC	188	Mendes <i>et al.</i> , 2007
Carbapenemase M β L	<i>bla</i> _{VIM}	GTTTGGTGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	382	Mendes <i>et al.</i> , 2007
Carbapenemase M β L	<i>bla</i> _{GIM-1}	TCGACACACCTTGGTCTGAA AACTTCCAACCTTGCCATGC	477	Mendes <i>et al.</i> , 2007
Carbapenemase M β L	<i>bla</i> _{SIM-1}	GTACAAGGGATTTCGGCATCG TGGCCTGTTCCCATGTGTGAG	569	Mendes <i>et al.</i> , 2007
Carbapenemase M β L	<i>bla</i> _{SPM}	CTA AATCGAGAGCCCTGCTTG CCT TTTCCGCGACCTTGATC	798	Mendes <i>et al.</i> , 2007
Carbapenemase: Classe A	<i>bla</i> _{GES}	ATGCGCTTCATTACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGG	846	Kim <i>et al.</i> , 2007
Carbapenemase: Classe A	<i>bla</i> _{KPC}	ATGTCAGTGTATCGCCGTCT TTTTCAAGAGCCTTACTGCCC	893	Bradford <i>et al.</i> , 2004
Carbapenemase Oxacilinase	<i>bla</i> _{Oxa-51}	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	353	Woodford <i>et al.</i> , 2006
Carbapenemase Oxacilinase	<i>bla</i> _{Oxa-23}	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCCAT	501	Woodford <i>et al.</i> , 2006
Carbapenemase Oxacilinase	<i>bla</i> _{Oxa-24}	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246	Woodford <i>et al.</i> , 2006
Carbapenemase Oxacilinase	<i>bla</i> _{Oxa-58}	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599	Woodford <i>et al.</i> , 2006
Seqüência de Inserção	<i>ISAba1</i>	CATTGGCATTAACTGAGGAGAAA TTGGAAATGGGGAAAACGAA	451	Ruiz <i>et al.</i> , 2007
Seqüência de Inserção	<i>ISAba1</i> <i>bla</i> _{Oxa-23-like}	AACGATTGCGAGCATC GTCAACCAGCCCACTT	1123	Zhou <i>et al.</i> , 2007
Membrana extrena	33- 36kDa	CATCGATGGCACTAACATGG AGTGTGACCACCCCAAACAT	175	Este estudo
ESBL	SCO-1	TGGCAGCGTTCCTTTCTCTCC ACCGTCGCAAGGAAAGGAGG	810	Poirel <i>et al.</i> , 2007
-	16S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGCTACCTTGTTACGACTT	1499	Mendes <i>et al.</i> , 2007

3.8 Reação de seqüenciamento

Após a amplificação do gene através da PCR, pelo menos um dos produtos gerados para cada reação foi submetido a uma nova reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores de interesse para seqüenciamento do gene e o gene amplificado foi submetido a uma purificação pelo kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification (Ge healthcare) conforme instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi estimada através de uma corrida de eletroforese em um gel de agarose a 2% utilizando o peso Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). E depois enviado para seqüenciamento.

O seqüenciamento do DNA a partir dos produtos de PCR foi realizado utilizando o MegaBACE 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia GE Healthcare. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo SequenaseTM II DNA Polimerase) código US81090. As sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. A seqüência genética foi comparada com banco de dados disponível na internet (BLAST – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

3.2.2 Diluição em agar para verificação do poder inibitório do NaCl sobre as enzimas oxacilinases (Adaptado de Pournaras *et al.*, 2006)

Para verificar o poder inibitório do NaCl sobre as oxacilinases, algumas amostras foram selecionadas (diferentes clones e todos isolados que apresentaram através da PCR o gene codificador para bla_{oxa-23-like}).

Para determinar essa inibição foi empregado o método de diluição em agar, seguindo as normas padronizadas pelo CLSI (CLSI, 2007). Para isso uma suspensão de microrganismos foi inoculada em placas contendo agar Mueller-Hinton acrescidas dos antibióticos testados (Meropenem ou Imipenem) em concentrações decrescentes de 512µg /mL a 4µg /mL dependendo da concentração inibitória inicial determinada pela metodologia de microdiluição em caldo. O teste foi realizado simultaneamente em três placas, sendo um contendo somente o antibiótico a ser testado e nas demais placas foram adicionados 200mM ou 400mM de NaCl para a verificação do poder de inibição deste sal sobre as enzimas oxacilinases. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

O teste foi considerado positivo quando houve a diminuição de 4 diluições ou mais na presença do sal NaCl.

Como controle de crescimento os isolados foram inoculados em agar Mueller-Hinton contendo 200mM ou 400mM de NaCl na ausência do antimicrobiano. A cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle negativo do teste

3 Detecção de Carbapenemases pelo método de Hodge modificado (Lee et al., 2001)

Preparação e padronização do inóculo: uma suspensão bacteriana da *E. coli* ATCC 25922 foi preparada a partir de uma placa com crescimento bacteriano de 18 a 24 horas, na escala 0,5 de McFarland e comparado com uma escala de turvação padrão e depois essa solução foi diluída na escala 1:10.

Inoculação da placa de meio de cultura: foi utilizado o agar Mueller-Hinton, conforme documento do CLSI (M7-A5, 2002). O procedimento é igual aquele realizado no método de difusão do disco. Após uma breve secagem (3 a 10 minutos) um disco de imipenem de 10µg foi inserido no centro da placa. A partir desse disco, foi realizado uma linha até a periferia da placa com um inóculo grosseiro (3 a 5 colônias) de uma cultura de crescimento em agar sangue com tempo de incubação de 18 a 24 horas do isolado a ser testado

Incubação do teste: as placas foram incubadas a 35°C por 16 a 20 horas , em posição invertida (lado do ágar para cima).

Leitura do teste: foi analisado o crescimento da cepa padrão *E. coli* ATCC 25922 na proximidade do isolado testado. A presença de um ganho de crescimento do isolado padrão próximo ao isolado testado indica positividade na produção de carbapenemase. A ausência desse ganho de crescimento indica uma negatividade do teste.

3.9 Avaliação de proteínas da membrana externa

Células bacterianas crescidas *overnight* foram subcultivadas em 45ml de caldo BHI e mantidas sob agitação a uma temperatura de 37°C. Após incubação de 24 horas, essas células foram submetidas a uma centrifugação de 5.000 rpm por 15 minutos. O *pellet* foi ressuspenso com tampão de fosfato sódico (PBS) a 10mM pH 7.0 acrescido com inibidor de protease fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF) a 1mM. As células foram sonicadas em gelo por 3 ciclos de 1 minuto cada, com intervalos de 1 minuto de resfriamento entre cada ciclo com o auxílio de um sonicador. Os restos celulares foram removidos por meio de centrifugação a 4300 rpm por 15 minutos a 4°C, ou pelo tempo necessário para que a sobrenadante torna-se límpido. O sobrenadante foi transferido para tubos de ultracentrifuga contendo 7ml PBS a 10mM pH 7.0 acrescido de PMSF a 1mM e centrifugado a 30.000 rpm (Ultracentrifuga Beckamm – L8 70M, USA) por 120 minutos para a coleta das frações de membrana. O *pellet* resultante foi ressuspendido com 150µl da solução tampão PBS a 10mM pH 7.0 acrescido de PMSF a 1mM. 100µl deste volume foi tratado com 800µl de sarcosil 2% e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Após centrifugação de 15.000 rpm durante 60 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso com 50µl de solução tampão PBS a 10mM pH 7.0 acrescido de PMSF a 1mM e mantido sobre refrigeração a 4°C por 24 horas para solubilização das proteínas. Posteriormente foi estocado a -20°C para posterior análise por SDS-PAGE.

As proteínas foram quantificadas pela metodologia de Bradford com o auxílio do reagente de Bradford (BioAgency Laboratórios) por espectrofotometria a 595nm (GeneQuant Pro, GE) e posteriormente tratadas com ácido beta-mercapto-etanol na proporção de 2µl de ácido beta-mercapto-etanol para 10µl de proteína. Essas proteínas foram levadas à fervura por 5 minutos com o tampão da amostra (Tris-HCl 0,5M, SDS 10%, Glicerina 20% e Azul de bromofenol 0,01%).

As proteínas foram aplicadas em géis de poliacrilamida previamente fabricados de 12,5% (Ge Healthcare) em uma concentração de 20ng. A corrida eletroforética será realizada no aparelho Multiphor II (GE) a 600 volts, 50 mA e 30 W por aproximadamente 60 minutos . Os pesos moleculares utilizados como marcadores foram: 97,4 KDa (fosforilase B de músculo de ratos), 66,2KDa (albumina sérica bovina), 45KDa (albumina de ovo), 31,0KDa (anidrase carbônica bovina), 21,51KDa (inibidor de tripsina) e 14,4KDa (lisozima).

Como controle foi utilizado a cepa ATCC de *A.baumannii* 19606, conhecida como sensível ao imipenem.

Após a eletroforese, o gel foi corado pelo kit PlusOne Silver Staining Kit, Protein (Ge Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Hidrólise de Imipenem

O teste de hidrólise de imipenem foi realizado em 28 amostras. Essas amostras foram selecionadas de acordo com perfis de DNA gerados pela

metodologia de PFGE. Foram incluídos ainda todos os isolados que indicaram a presença de gene de carbapenemase pela técnica da PCR.

Para esse teste, as amostras foram repicadas em meio agar sangue de carneiro 5%, e incubadas por 18-24h a 37°C. % colônias foram inoculadas em 5mL de caldo TSB e incubadas sob agitação por 18h a 37°C. Os tubos contendo as amostras foram submetidos a uma centrifugação de 3.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido com 1mL do tampão da amostra. Para as amostras que apresentaram a presença de genes codificadores de MβL foi usado um tampão de Tris-HCl 1mM e ZnSO₄ 1mM e para as amostras que apresentaram a presença de genes codificadores de Oxacilinases foi usado um tampão de Fosfato de sódio a 25mM (pH 7.0). As amostras foram submetidas a sonicação (4 ciclos por 30 segundos). O produto sonicado foi transferido para um microtubo e submetido a uma centrifugação de 13.000rpm por 3 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e mantido no gelo até a realização da análise espectrofotométrica. A absorbância foi medida em 299nm com a presença de uma solução de 100μM de Imipenem (Merck Sharp Dome, EUA) em uma quantidade de 1800μL de solução de Imipenem com 200μL de extrato protéico. Foi utilizado como controle uma cepa *P. aeruginosa* produtora da enzima SPM-1 e como controle negativo a cepa *E. coli* ATCC 25922. As amostras que apresentaram teste positivo para a hidrolise do imipenem foram submetidos a inibição da atividade enzimática pelo EDTA (0,5M pH8.0) e NaCl (1M). Para isso 235μL do extrato protéico foi incubado a temperatura ambiente durante 20 minutos com 15μL de EDTA

ou NaCl. Como controle positivo para cada reação de inibição 235µL do extrato protéico de cada amostra foi incubado com 15µL de tampão da amostra a temperatura ambiente por 20 minutos. O teste em que se observou a ausência de variação da absorbância do extrato na presença do antimicrobiano Imipenem e do respectivo inibidor foi considerado positivo para a inibição.

As proteínas foram quantificadas pela metodologia de Bradford com o auxílio do reagente de Bradford (BioAgency Laboratórios) por espectrofotometria a 595nm (GeneQuant Pro, GE) para averiguação da extração.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação das cepas bacterianas

Os isolados de *Acinetobacter* spp foram re-identificados pelo método manual API20 NE (bioMérieux-França). Todas as amostras foram identificadas como pertencentes ao complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*. Essa metodologia não possui poder discriminatório entre as espécies pertencentes a esse grupo.

A figura 1 mostra gráfico de distribuição dos isolados de *Acinetobacter* sp. de acordo com o ano de isolamento, unidades e clínicas de internação no Hospital das Clínicas-FMUSP. Neste gráfico foram excluídas 5 isolados, avaliados no estudo, que não possuíam dados de internação.

NOTA: Complexo Hospital das Clínicas - Unidades de Terapia Intensiva Cirúrgicas: UTI-Cir; Unidades de Terapia Intensiva Clínicas: UTI- Cli; Unidades de Enfermaria Clínicas: UE-Cli; Unidades de enfermaria Cirúrgicas: EU- Cir e Instituto do coração: INCOR.

Figura 1 - Gráfico ilustrativo da distribuição dos isolados de *Acinetobacter* no período dos anos de 2002 a 2004 no HC-FMUSP

4.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Foram determinadas as CIM de dois carbapenêmicos, pelo método de microdiluição em caldo, para os 50 isolados de *Acinetobacter* (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição de 50 isolados de *Acinetobacter* spp. em relação às concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos imipenem e meropenem

Antimicrobiano	Imipenem (ug/mL)				
Meropenem (ug/mL)	16	32	64	128	256
16	1				
32	4	1			
64		4	2	2	1
128	2	3	8	5	
256		6	6	5	

4.7 Análise da clonalidade dos isolados por eletroforese em campo pulsado (PFGE)

De acordo com os critérios estabelecidos por Tenover (1995), analisando-se visualmente os perfis de DNA gerados por PFGE, foram obtidos 22 perfis diferentes distribuídos em dez *clusters*. O *cluster* majoritário (62% dos isolados analisados) foi designado com uma letra (letra A) e os demais com as consecutivas letras do alfabeto. Os diferentes perfis de DNA, relacionados ao mesmo *cluster* (seis ou menos bandas distintas entre os perfis de DNA gerado pela PFGE), foram designados pela letra correspondente e um número.

Do total de 50 isolados analisados, 7 (14%) apresentaram um mesmo padrão molecular, denominado de padrão predominante ou padrão A1. Cinco (10%) dos isolados analisados mostraram-se estreitamente relacionados ao padrão predominante e 19 (38%) foram classificados como possivelmente relacionados. 19 (38%) dos isolados não demonstraram nenhuma relação com o grupo majoritário A (número de fragmentos diferentes maior ou igual a 7) (Tabela 5).

Dentre os 22 perfis, o padrão A (7 isolados) apresentou concentrações inibitórias mínimas para imipenem variando de 16 a 64µg/mL e incluíram somente duas β-lactamases como mecanismo de resistência (Oxa-51-*like* e Oxa-23-*like*). O outro perfil majoritário com um total de 7 isolados, denominado A3, apresentou concentrações inibitórias mínimas variando 32 a 64µg/mL nesses isolados somente um tipo de β-lactamase esteve presente (Oxa-51-*like*).

Tabela 5 - Relação entre as concentrações inibitórias mínimas (CIM), tipo de oxacilinase encontrada por PCR multiplex, tipagem molecular por PFGE e unidade clínica de internação e data de isolamento da cepa de *Acinetobacter*

AMOSTRA	CIM IMP (ug/mL)	CIM MERO (ug/mL)	DATA DA COLETA	CLÍNICA	MECANISMO DE RESISTÊNCIA	PERFIL PFGE
6	128,0	128,0	01/06/02	E1MH	51/IMP	C
7	128,0	64,0	02/06/02	E1MH	51/IMP	C
8	32,0	64,0	11/07/02	UPSM	51	A3
10	64,0	128,0	19/09/02	U2CC	51	A3
13	128,0	128,0	04/05/03	UPSM	51	J
14	64,0	128,0			51	B1
18	128,0	256,0			51	A3
19	64,0	128,0	21/08/03	EICO	51	A3
21	128,0	256,0	21/08/03	U1MH	51	A3
23	128,0	256,0	21/08/03	UMIN	51	B1
24	64,0	128,0	21/08/03	EICO	51	A3
25	64,0	128,0		EICO	51	D
26	128,0	128,0			51	A3
28	64,0	128,0	07/08/03	ECPL	51	A2
30	256,0	64,0	24/07/02	EPSM	51/IMP	E
35	64,0	128,0	05/08/03	ETMO	51	A7
38	128,0	256,0	20/10/03	UQUE	51	A6
42	128,0	256,0	01/12/03	E2CG	51	B1
43	128,0	128,0	05/12/03	ETMO	51/IMP	F
44	128,0	64,0	06/12/03	ETMO	51	A5
45	128,0	128,0	06/12/03	U1MR	51	A11
46	64,0	256,0	12/1/2004	E1MH	51	B2
47	32,0	256,0	13/1/2004	U1MR	51	B2
48	64,0	256,0	22/1/2004	E1MH	51	B2
49	32,0	64,0	25/1/2004	EICO	51	G
50	64,0	256,0	16/2/2004	E1MH	51	B1
51	32,0	256,0	7/3/2004	UPSM	51	A8
52	16,0	32,0	23/3/2004	EICO	IMP	H
53	32,0	256,0	3/4/2004	EUTR	51	A8
54	32,0	256,0	9/5/2004	UPSM	51	B2
55	64,0	64,0	14/5/2004	U1MH	51	I
56	16,0	128,0	17/5/2004	UQUE	51	A2
57	32,0	128,0	12/6/2004	UQUE	51	A4
58	32,0	128,0	18/6/2004	U2CC	51	A4
59	16,0	128,0	24/6/2004	U2CC	51	A4
60	32,0	128,0	1/7/2004	EPSC	51	A8
61	16,0	16,0	8/7/2004	ECMG	23/51	A9
63	32,0	256,0	28/8/2004	UQUE	51	A2
64	32,0	256,0	31/8/2004	UQUE	51	A2
65	32,0	64,0	10/9/2004	EMIN	23/51	A1
67	64,0	256,0	5/10/2004	U1CC	51	B3
68	64,0	256,0	6/10/2004	EUTR	51	A2
69	32,0	64,0	25/10/2004	EICO	23/51	A1
70	16,0	32,0	5/11/2004	UNEU	23/51	A1
71	16,0	32,0	10/11/2004	E1CH	23/51	A1
72	64,0	256,0	12/11/2004	UQUE	51	B3
73	64,0	128,0	15/11/2004	UQUE	23/51	A2
75	64,0	64,0	3/12/2004	E2CG	23/51	A1
76	16,0	32,0	10/12/2004	E2CR	23/51	A1
77	32,0	32,0	11/12/2004	UPSM	23/51	A1

NOTA: Unidades de Terapia Intensiva Cirúrgicas: U1CC, U2CC, UQUE; Unidades de Terapia Intensiva Clínicas: UNEU, U1MH, UPSM, U1MR; Unidades de Enfermaria Clínicas: EMIN, E1MH, EPSM, ETMO, ECMG, E2CG; Unidades de enfermaria Cirúrgicas: EPSC, ECPL, EUTR, E1CH e INCOR: EICO.

Tabela 6 - Relação entre os perfis de sensibilidade para imipenem (IMP) e os perfis moleculares gerados a partir do método de eletroforese em campo pulsado de 50 isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes ao imipenem

CIM IMP (µg/mL)	PERFIS DE PFGE				
	Padrão A	Estritamente relacionados	Possivelmente relacionados	Não relacionados	Total
16	3	1	2	1	7
32	3	2	6	3	14
64	1	2	5	8	16
128	0	0	6	6	12
256	0	0	0	1	1

Coluna 1- Peso molecular, colunas 2, 3, 4 cepas padrão B2, coluna 5 perfil G, coluna 6 perfil B1, coluna 7 perfil A8, coluna 8 perfil H, coluna 9 perfil A8, coluna 10 perfil B2, coluna 11 peso molecular, coluna 12 perfil I, coluna 13 perfil A2, coluna 14, 15, 16 perfil A4, coluna 17 perfil A8, coluna 18 perfil A9.

Figura 2 - Representação do perfil de bandas obtido a partir do método de eletroforese em campo pulsado, utilizando-se a enzima de restrição *Sma*I em amostras de *Acinetobacter* spp.

4.3 Reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR)

4.3.1 Reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para detecção de genes de oxacilinases e das Metallo- β -lactamases IMP, VIM, SIM e SPM

Para detecção dos genes de oxacilinase e das Metallo- β -lactamases foi realizado PCR multiplex de todas as 50 amostras de *Acinetobacter baumannii*. Quarenta e nove isolados (98%) apresentaram positividade para o grupo OXA-51-like, sendo assim identificados como da espécie *A. baumannii*. Nove isolados (18%) apresentaram positividade para o grupo OXA-23-like e em um caso não foi observado a presença de nenhum gene de oxacilinase. Dez por cento (5 isolados) delas apresentaram a presença do gene IMP, nenhum dos isolados apresentou positividade para os genes VIM, SIM, SPM, grupo OXA-58-like e OXA-24-like (Tabela 7)

Colunas 1 e 15 – controles negativos, coluna 2 – controles positivos para os genes *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-23-like}, coluna 3 – controle positivo para os genes *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-24-like}, coluna 4- controle positivo para o gene *bla*_{IMP}, coluna 5 –controle positivo para o gene *bla*_{vim}, coluna 6- controle positivo para o gene *bla*_{sim}, colunas 7,8 e 14 isolados positivos para o gene *bla*_{OXA-51-like}, colunas 9-11 isolados positivos para os genes *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-23-like}, colunas 12 e 13 isolados positivos para os genes *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{IMP}.

Figura 3 – Foto de gel de eletroforese – PCR Multiplex para detecção dos genes de oxacilinas e metalo- β -lactamases de isolados de *Acinetobacter* spp.

A amostra que não apresentou a banda específica para o gene *bla*_{oxa-51-like} foi considerada como pertencente ao grupamento *A. calcoaceticus* – *A. baumannii*, mas como não *A. baumannii*. Essa amostra foi submetida a uma reação de PCR para seqüenciamento do gene 16S. Após análise comparativa no programa BLAST, essa amostra foi designada como *A. calcoaceticus*.

As amostras positivas para IMP, também foram submetidas a reação de seqüenciamento, e após comparação com o banco de dados todas foram denominadas como IMP-1 (BLAST – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Tabela 7- Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) de 50 isolados de *Acinetobacter sp* distribuídos de acordo com o gene codificador de Carbapenemase detectado por PCR.

<i>Acinetobacter spp.</i>	gene	número de isolados	antibiótico	CIM (µg/mL)		
				variação	CIM50	CIM90
<i>A. baumannii</i>	<i>bla_{oxa-51-like}</i>	36	imipenem	16-128	64	128
			meropenem	64-256	128	256
	<i>bla_{oxa-51-like/oxa-23-like}</i>	9	imipenem	16-64	32	64
			meropenem	16-128	32	64
	<i>bla_{oxa-51-like/imp}</i>	4	imipenem	128-256	128	64
			meropenem	64-128	256	128
<i>A. calcoaceticus</i>	<i>bla_{imp}</i>	1	imipenem	16	16	16
			meropenem	32	32	32
Todos	todos	50	imipenem	16-256	64	128
			meropenem	16-256	128	128

4.3.2 Reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene promotor IS_{Aba-1}

A identificação do gene promotor IS_{Aba-1} foi realizada através de uma PCR (Figura 3). Duas amostras não apresentaram a presença desse gene.

Essas amostras possuíam CIMs de 64 e 128 µg/mL de imipenem e nenhum gene de resistência diferente do gene *bla_{oxa 51-like}* foi encontrado (Tabela 8).

PM- peso molecular; coluna 1 e 17 – controles de esterilidade; coluna 3 – controle positivo; coluna 2 e 4 – ATCC – controle negativo; colunas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 amostras positivas. Bandas de 1499pb - 16S e de 451bp – ISAba1

Figura 4 – Foto de gel com resultados da Reação de Amplificação em cadeia da Polimerase para detecção do gene promotor ISAba-1 em isolados de *Acinetobacter* spp.

Tabela 8- Relação entre os perfis de sensibilidade para Imipenem (IMP) e Meropenem (MERO) e os perfis encontrados pela PCR multiplex para a detecção de genes codificadores de oxacilinasas e das Metallo- β -lactamases de isolados de *Acinetobacter* spp.

CIM IMP/MERO (ug/mL)	GENE				
	bla oxa 23/51	bla oxa 51	bla IMP/ oxa 51	bla IMP	ISAba-1
16/16	1	0	0	0	1
16/32	3	0	0	1	4
16/128	0	2	0	0	2
32/32	1	0	0	0	1
32/64	2	2	0	0	4
32/128	0	3	0	0	3
32/256	0	6	0	0	6
64/64	1	1	0	0	2
64/128	1	7	0	0	8
64/256	0	6	0	0	5
128/64	0	1	1	0	1
128/128	0	3	2	0	5
128/256	0	5	0	0	5
256/256	0	0	1	0	1
TOTAL	9	36	4	1	48

4.3.3 Reação de polimerase em cadeia (PCR) para detecção do gene promotor ISAba-1 adjacente ao gene codificador da oxacilinase Oxa-23-*like*.

A identificação do gene promotor ISAba-1 adjacente ao gene codificador da enzima Oxa-23-*like* foi realizada através de uma PCR (Figura 3). Das nove amostras previamente positivas para a presença do gene codificador da enzima Oxa-23-*like*, somente um isolado não apresentou a presença desse gene.

Tabela 9- Relação entre as concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos imipenem e meropenem e a presença do gene IS*Aba*1 adjacente ao gene codificador da enzima Oxa-23-*like* de isolados de *Acinetobacter* spp.

Amostras	CIM IMP ($\mu\text{g/mL}$)	CIM MERO ($\mu\text{g/mL}$)	Presença de IS <i>Aba</i> 1 adjacente a Oxa-23- <i>like</i>
61	16,0	16,0	Presente
65	32,0	64,0	Presente
69	32,0	64,0	Presente
70	16,0	32,0	Presente
71	16,0	32,0	Presente
73	64,0	128,0	Ausente
75	64,0	64,0	Presente
76	16,0	32,0	Presente
77	32,0	32,0	Presente

PM - peso molecular; amostras feitas em duplicata - coluna 1 e 18 – controles de esterilidade; coluna 2 a 11 – amostras positivas; coluna 12 e 13 – amostra negativa (73); colunas 14 a 17 – amostras positivas.

Figura 5 - Reação de amplificação em cadeia da polimerase para detecção do gene IS*Aba*-1 adjacente ao gene codificador da enzima Oxa-23-*like* em isolados de *Acinetobacter* spp.

4.3.3 Reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de outras carbapenemases

Para a detecção de outras carbapenemases como SCO-1, KPC e GES foram realizadas PCRs com primers específicos. Nenhuma das amostras avaliadas neste estudo apresentou positividade para os genes codificadores dessas enzimas.

4.4 Detecção fenotípica de Metallo- β -lactamase pelo método do Etest®

A detecção de Metallo- β -lactamase foi determinada de acordo com os critérios propostos por Walsh *et al.* (2002). Todas as amostras foram testadas com fitas de Etest para MBL, onde uma extremidade contém imipenem (IP) e na outra imipenem associado com EDTA (IPI) demonstrado na figura 5 (AB Biodisk (North América Inc., N.J.)

Somente 4 amostras (8%) se mostraram negativas frente ao teste.

A partir da comparação com o padrão ouro ("gold standard") usado, PCR para o gene IMP que caracterizou as metallo- β -lactamases presentes nas amostras, observou-se que o Etest tem sensibilidade de 100%, especificidade de 8,89%, valor preditivo positivo (cepas MBL positivo e Etest positivo) de 10,87% e valor preditivo negativo (cepas MBL negativo e Etest negativo) de 100%.

Figura 6 - Determinação da concentração inibitória mínima e detecção de Metallo- β -lactamase por fita de Etest[®] com EDTA de uma amostra clínica de *Acinetobacter* spp.

4.5 Detecção fenotípica de Metallo- β -lactamase pelo método de aproximação de disco

Na detecção de Metallo- β -lactamase pelo método de aproximação de disco proposto por Arakawa *et al.*, os resultados foram obtido de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10 – Avaliação de duas técnicas fenotípicas para a detecção da produção de Metallo- β -lactamase em isolados de *Acinetobacter* spp por aproximação de disco em comparação com a metodologia de padrão ouro – PCR

Resultado	SCREENING PARA MBL				
	Aproximação com IMP (DDST)		Aproximação com CAZ (DDST)		Diferença maior que 8mm entre os diâmetros de IMP e IMPE (CD)
	EDTA	ABM	EDTA	ABM	
Positivo	2	18	46	47	32
Negativo	48	32	4	3	18
Sensibilidade	40%	100%	100%	60%	100%
Especificidade	100%	71%	8,80%	2%	40%

NOTA: IMP: Imipenem, CAZ: Ceftazidima, EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético, ABM: Ácido β -mercaptoetanol, IMPE – Imipenem impregnado com EDTA

A partir da comparação com o padrão ouro ("gold standard") usado, PCR para o gene IMP que caracterizou as metallo- β -lactamases presentes nas amostras, observou-se que o teste de aproximação do antibiótico imipenem com um disco impregnado com 3 μ L do β -mercaptoetanol demonstrou uma maior sensibilidade e especificidade quando comparado com os demais testes. Sendo a sensibilidade de 100%, especificidade de 71%, valor preditivo positivo de 28% e valor preditivo negativo de 100%.

4.6 Detecção fenotípica de β -lactamase de espectro estendido (ESBL)

A detecção de ESBL por aproximação de disco de ácido clavulânico foi realizada para todas as cepas. O resultado foi negativo em todos os casos, mesmo com a adição de cloxacilina sódica ao meio de cultura.

Hidrólise do Imipenem

O teste de hidrólise de imipenem foi realizado em 28 amostras. Destas amostras somente 6 isolados apresentaram uma queda na absorbância indicando a hidrólise do antimicrobiano.

Duas amostras apresentaram a presença de hidrólise e a inibição posterior dessa atividade com o EDTA, mas não foram identificados nenhum gene produtor de M β L através da PCR. Essas amostras tinham CIMs de 128-64ug/mL e 64ug/mL para imipenem e meropenem respectivamente.

Tabela 11- Resultados do teste de hidrólise do Imipenem para 28 isolados de *Acinetobacter sp.* de diferentes *clusters* identificados pela PFGE.

Carbapenemase	Resultado Teste de hidrólise do Imipenem	CIM (ug/mL) Imipenem		
		Intervalo	CIM50	CIM90
Oxa 51 N=14	Positivo (2)	64-128	64	128
	Negativo (12)	16-128	64	128
Oxa 51/23 N=9	Positivo (1)	32	32	32
	Negativo (8)	16-64	16	64
Oxa 51/IMP N=4	Positivo (2)	128-128	128	128
	Negativo (2)	128-256	128	256
IMP* N=1	Positivo (1) Negativo (0)	16	16	16

* Isolado negativo para o gene Oxa 51 pela técnica da PCR, identificado pelo seqüenciamento do gene 16S como *A. calcoaceticus*

3 Detecção de Carbapenemases pelo método de Hodge modificado (Lee *et al.*, 2001)

Dos 50 isolados analisados 19 (38%) foram negativos e 31 isolados (62%) foram positivos para esse teste. Todos isolados com a presença do gene *bla_{imp}* foram positivos e apenas duas amostras com a presença do gene *bla_{oxa-23-like}* não foram positivas para este teste (Tabela 12)

Comparando esses resultados com os obtidos de algumas amostras que foram submetidas a reação de hidrólise do imipenem, o teste de Hodge modificado obteve uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 36% (Tabela 13).

Tabela 12 - Resultados do teste de Hodge modificado de 50 isolados de *Acinetobacter sp.*

Carbapenemase	Resultado Teste de Hodge	CIM (ug/ml) Imipenem		
		Intervalo	CIM50	CIM90
Oxa 51	Positivo (19)	32-128	64	128
	Negativo (17)	16-128	32	128
Oxa 51/23	Positivo (7)	16-32	16	32
	Negativo (2)	64	64	64
Oxa 51/IMP	Positivo (4)	128-256	128	256
	Negativo (0)			
IMP	Positivo (1)	16	16	16
	Negativo (0)			

Tabela 13 - Resultados do teste de Hodge modificado de 28 isolados de *Acinetobacter sp.* para os quais foram realizados testes de hidrólise

Hodge	Hidrólise		Total
	positivo	negativo	
positivo	6	14	20
negativo	0	8	8
Total	6	22	28

3.2.2 Diluição em agar para verificação do poder inibitório do NaCl sobre as enzimas oxacilinases

A análise do poder inibitório do NaCl sobre as enzimas oxacilinases foi realizada para as nove amostras cujo PCR mostrou a presença do gene codificador para a enzima Oxa-23.

Comparativamente com os resultados obtidos do teste da hidrólise do antibiótico imipenem, o teste de inibição das enzimas oxacilinases não apresentou boa sensibilidade para nenhum dos antibióticos testados considerando as concentrações de 200 μ M e 400 μ M de NaCl (Sensibilidade de 0% e Especificidade de 100% e 22% para as concentrações de 200 μ M e 400 μ M de NaCl respectivamente).

Tabela 14 - Resultados do poder inibitório do NaCl sobre as enzimas oxacilinases, teste de Hodge e hidrólise do imipenem para nove isolados de *Acinetobacter sp* com a presença do gene codificador para a enzima Oxa-23.

Isolados	CIM (ug/mL)		Presença de IS <i>Aba1</i> + oxa23	Variação (diluições) da CIM de Imipenem na presença de NaCl		Variação (diluições) da CIM de Meropenem na presença de NaCl		Hodge	Hidrólise do Imipenem
	Imipenem	Meropenem		200uM	400uM	200uM	400uM		
61	16,0	16,0	+	1	2	0	2	+	-
65	32,0	64,0	+	1	2	3	5	+	-
69	32,0	64,0	+	1	2	2	6	+	-
70	16,0	32,0	+	1	2	1	4	+	-
71	16,0	32,0	+	1	2	2	4	+	-
73	64,0	128,0	-	2	3	3	4	-	-
75	64,0	64,0	+	1	2	1	3	-	-
76	16,0	32,0	+	1	3	2	4	+	-
77	32,0	32,0	+	1	2	0	3	+	+

4.9 Análise das proteínas de membrana externa

4.9.1 SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

O perfil de proteínas da membrana externa foi estudado em vinte e seis isolados selecionados pelos perfis identificados pela metodologia de PFGE.

Os isolados foram comparados com uma amostra sensível padrão (*A. baumannii* ATCC 19606), nesse caso foram comparadas 3 proteínas de pesos diferentes, suas ausências ou mesmo diminuição da quantidade já foram previamente relacionadas com a resistência aos antibióticos carbapenêmicos (43kDa, 33-36kDa e 29kDa).

Tabela 15 - Avaliação das proteínas de membrana externa de 26 isolados de *Acinetobacter* sp resistentes aos antibióticos carbapenêmicos quando comparadas com isolado sensível (ATCC 19606).

Isolados	PROTEÍNAS DE INTERESSE			CIM (ug/mL)		Gene detectado por PCR de beta-lactamase
	29kDa	33-36kDa	43kDa	IMP	MERO	
ATCC 19606	(+++)	(+++)	(+++)	-	-	
6	(+++)	(+++)	(++)	128	128	oxa - 51- like e IMP
7	(+++)	(+++)	(+++)	128	64	oxa-51-like
8	(+)	(+++)	(+)	32	64	oxa-51-like
10	(+++)	(+++)	(+++)	64	128	oxa-51-like
13	(+++)	(+++)	(+++)	128	128	oxa-51-like
23	(+)	(+++)	(+)	128	256	oxa-51-like
25	(+++)	(++++)	(+++)	64	128	oxa-51- like
30	(+)	(++)	ausente	256	64	oxa - 51- like e IMP
35	(+++)	(+++)	ausente	64	128	oxa-51- like
38	(+)	(+++)	ausente	128	256	oxa-51- like
43	(+++)	(+++)	(+++)	128	128	oxa - 51- like e IMP
44	(+++)	(+++)	(+++)	128	64	oxa-51- like
45	ausente	(+++)	ausente	128	128	oxa-51- like
46	ausente	(+++)	ausente	64	256	oxa-51- like
49	ausente	(+++)	ausente	32	64	oxa-51- like
51	(++)	(++)	(+++)	32	256	oxa-51- like
52	(+)	(++++)	(+)	16	32	IMP
55	(+++)	(+++)	(++)	64	64	oxa-51- like
56	(++)	(+++)	(+++)	16	128	oxa-51- like
57	(+)	(+++)	(+)	32	128	oxa-51- like
61	(+++)	(+++)	(+++)	16	16	oxa-51- like e oxa-23-like
67	(+)	(++)	(+)	64	256	oxa-51- like
68	(+++)	(+)	ausente	64	256	oxa-51- like
69	(+)	(++)	(+)	32	64	oxa-51- like e oxa-23-like
70	(++)	(+++)	(++)	16	32	oxa-51- like e oxa-23-like
72	(++)	(+)	(+++)	64	256	oxa-51- like

(+++)- Intensidade da banda igual a da banda da cepa *A. baumannii* ATCC 19606, (++) – Intensidade da banda 1 vez menor que a banda da cepa *A. baumannii* ATCC 19606, (+) – Intensidade da banda 2 vezes menor que a banda da cepa *A. baumannii* ATCC 19606, (++++)-Intensidade da banda maior que a banda da cepa *A. baumannii* ATCC 19606

Pontos vermelhos mostram as proteínas de diferentes pesos, suas ausências ou mesmo diminuição da quantidade já foram previamente relacionadas com a resistência aos β -lactâmicos carbapenêmicos (43kDa, 33-36kDa e 29kDa).

Figura 7 – Foto de Gel de SDS-PAGE de proteínas da membrana externa de isolados de *Acinetobacter* spp.

4.9.2 Reação de amplificação em cadeia da (PCR) para detecção do gene codificador da proteína de membrana externa de 33-36kDa

A PCR para identificação do gene codificador das proteínas de membrana externa de 33-36kDa foi padronizada e os seguintes parâmetros de amplificação foram considerados ótimos: denaturação 95°C por 7 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por um minuto e 72°C por um minuto, seguida de curva de anelamento de 72°C por 10 minutos.

Para a realização da PCR as amostras foram selecionadas de acordo com o perfil gerado pelo corte da enzima Sma1 pela metodologia de PFGE, das 32 amostras amplificadas. Apenas uma amostra não apresentou a banda específica de 175bp.

O produto de PCR de uma das amostras foi submetido ao seqüenciamento e demonstrou uma similaridade de 99% com o gene da proteína de membrana externa de 33-36kDa (BLAST – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

PM – peso molecular; colunas 1 e 5 - controle de esterilidade; colunas 2, 3, 4 – amostras positivas.

Figura 8 – Foto de gel de reação de amplificação em cadeia da polimerase para a identificação do gene codificador da proteína de membrana externa de 33-36kDa de isolados de *Acinetobacter* spp.

DISCUSSÃO

Acinetobacter é considerado um patógeno oportunista que acomete principalmente imunocomprometidos e pacientes com prolongado período de internação hospitalar (Brown *et al.*, 2004, Joly-Guillou, 2005). Apesar de ser um microorganismo que apresenta pouca virulência, tornou-se um problema para muitos hospitais devido a sua resistência intrínseca a vários antibióticos, assim como a sua facilidade em acumular mecanismos de resistência e sua habilidade em sobreviver por longos períodos em superfícies inanimadas (Brown *et al.*, 2004, Joly-Guillou, 2005).

As espécies desse gênero podem variar em relação ao seu potencial patogênico ou mesmo a sua suscetibilidade aos antimicrobianos, sendo o grupamento *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* o de maior importância clínica. Nesse aspecto se faz necessário a identificação ao nível de espécies (Peleg *et al.*, 2008 e Bosshard *et al.*, 2005), o que é dificultado pela grande similaridade fenotípica do gênero (Bergogne-Bérézin e Towner, 1996).

No presente estudo a metodologia utilizada para a identificação foi o sistema fenotípico miniaturizado API20NE. Esse sistema manual mostrou satisfatório ao identificar o grupamento *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*, mas não conseguiu diferenciar as espécies contidas nesse grupo. A diferenciação das espécies foi possível devido à identificação através de PCR do gene *bla_{oxa-51-like}* intrínseco da espécie *A. baumannii*, já demonstrado em 2005 por Héritier e colaboradores como um bom marcador para essa espécie, e pelo seqüenciamento do gene codificador do RNA ribossomal 16S.

A única espécie não identificada como *A. baumannii*, após análise do seqüenciamento do gene codificador do RNA 16S foi designada como *A. calcoaceticus*.

Em 2005, em um estudo comparativo das metodologias de identificação de Gram-negativos, Bosshard e colaboradores mostraram que o seqüenciamento do gene codificador da porção 16S do ribossomo foi mais eficiente em diferenciar as espécies de *Acinetobacter* quando comparado com outras metodologias como API20NE e o sistema automatizado Vitek®.

Em comparação com as demais regiões do mundo, *Acinetobacter spp* multirresistentes parece ser mais importante no Brasil e em outros países da América Latina (Reinert *et al.*, 2007). Gales e colaboradores no ano de 2005 ao relatarem um estudo SENTRY do período de 2001 a 2004 que avaliou 2.621 isolados de *Acinetobacter sp* de diferentes sítios de infecção, mostraram que os países da América Latina, em destaque o Brasil, apresentaram um número maior de infecções por isolados de *Acinetobacter sp* resistentes aos carbapenêmicos do que outros países como Estados Unidos.

Os principais mecanismos ligados a essa resistência são a produção de carbapenemases, seguidas pelas alterações de membrana externa, alterações de PBPs e em menor escala a hiperexpressão de mecanismos de efluxo (Livermore *et al.*, 2002; Clark., 2003, Mendes *et al.*, 2006).

Várias metodologias fenotípicas para detecção de carbapenemase foram avaliadas no presente estudo. A metodologia de Hodge modificada proposta pelo CLSI se mostrou eficaz em identificar os isolados que

apresentavam genes de resistência de M β L, mas o mesmo não foi observado na detecção das oxacilinases.

Quando se utilizou o teste de hidrólise de imipenem como um padrão ouro, essa metodologia se mostrou menos eficaz na detecção das carbapenemases e apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 35% para o total das 23 amostras analisadas.

Em um estudo de Lee e colaboradores de 2001, ao comparar essa metodologia com a hidrólise dos antimicrobianos carbapenêmicos em 28 isolados de *Acinetobacter sp*, mostraram que esse teste não detectou a presença de carbapenemases em 4 isolados que apresentavam hidrólise do imipenem, sendo os demais resultados para as outras amostras condizentes com aqueles encontrados pelo teste de hidrólise.

Apenas cinco dos isolados do presente estudo apresentaram enzimas do grupo M β L. Desses isolados aqueles que apresentaram o gene *bla*_{oxa-51-like} associado com o gene *bla*_{imp} (4 isolados) expressaram CIMs para o imipenem e o meropenem relativamente altas quando comparados com os demais isolados (16 a 256 μ g/mL e 64 a 128 μ g/mL para imipenem e meropenem respectivamente). Esses achados estão de acordo com a literatura que mostra que isolados que possuem genes produtores de enzimas M β Ls apresentam maiores CIMs para os antimicrobianos carbapenêmicos quando comparados a produtores de outras carbapenemases como as oxacilinases (Towner *et al.*, 2008). Apesar dessas concentrações inibitórias mais altas que das demais amostras somente 3

desses isolados apresentaram enzimas que conseguiram hidrolisar imipenem.

O isolado 30 que apresentou o gene codificador para a enzima IMP, apresentou a maior CIM para o antimicrobiano imipenem (256µg/mL), esse fato foi decorrente provavelmente da ausência das proteínas de 29kDa e de 43kDa da membrana externa (ausentes no SDS-PAGE), já que este isolado não apresentou hidrólise para o antimicrobiano Imipenem. Evidenciando que apesar de presente o gene *bla_{imp}* não estava aparentemente expresso.

Todos os cinco isolados portadores dos genes *bla_{imp}* eram de diferentes clones, com exceção de dois isolados que eram do mesmo paciente, evidenciando assim a disseminação não clonal desse gene de resistência no Hospital das Clínicas, inclusive para uma espécie diferente de *A. baumannii* como a espécie *A. calcoaceticus* relatada nesse estudo.

Após análise do seqüenciamento, constatou-se que essas amostras eram IMP-1. Apesar de outras classes de MβL já terem sido descritas em outros gêneros, IMP-1 ainda é a única classe de MβL descrita em *Acinetobacter* no Brasil (Tognim *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2006; Sader *et al.*, 2005; Gales *et al.*, 2003).

Dois isolados que apresentaram hidrólise do imipenem, mostraram através da inibição com o EDTA serem possíveis produtores de enzimas da classe das MβL, mesmo assim essas amostras não foram positivas para a detecção de nenhum dos genes de MβL estudados. Esse fato pode estar relacionado a presença de uma nova enzima MβL.

Outra classe de carbapenemases descritas em *Acinetobacter* são as oxacilinases. Como já dito anteriormente, essas enzimas possuem um menor poder de hidrólise dos carbapenêmicos quando comparadas com as MβL, mas elas ainda são as carbapenemases mais descritas neste gênero de bactéria (Boo e Crowley, 2009). Em um estudo chinês de 2008, que analisou 31 isolados de *Acinetobacter* multirresistentes, as oxacilinases estiveram presentes em 72,4% dos isolados, contra 51,2% de MβL (Sung *et al.*, 2008). Mesmo tendo um baixo poder de hidrólise quando comparadas as MβL, as oxacilinases tem sido apontadas como as enzimas que mais freqüentemente conferem resistência em *Acinetobacter* (Yang *et al.*, 2010; Bier *et al.*, 2010).

No presente estudo as únicas oxacilinases encontradas foram as dos grupamentos Oxa-51-like e Oxa-23-like. Os genes cromossomais do grupo *bla_{Oxa-51-like}* são considerados intrínsecos da espécie *A. baumannii*, podendo variar entre si em alguns aminoácidos mas compartilhando de uma grande similaridade. Em 2009 esse gene foi encontrado em uma espécie não-*baumannii*, tratava-se de um gene locado em um plasmídio, facilitando assim sua disseminação (Lee *et al.*, 2009).

Dentre as enzimas pertencentes a esse grupo, pode-se destacar a Oxa-66 e Oxa-69 que foram relacionadas em alguns estudos como responsáveis pela diminuição da suscetibilidade do *Acinetobacter* ao antimicrobiano imipenem, provavelmente devido a uma hiperexpressão dessas enzimas estimuladas pela seqüência de inserção IS*Aba-1*, já que

estas enzimas mostram ter um pequeno poder de hidrólise para os carbapenêmicos (Lu *et al.*, 2009; Peleg *et al.*, 2008; Turton *et al.*, 2006).

Hu e colaboradores em 2007, relacionaram a resistência ao imipenem a uma hiperexpressão da enzima Oxa-66 pela presença da seqüência de inserção, IS*Aba-1*, acima do gene *bla_{oxa-51-like}* e pela expressão de um provável mecanismo de efluxo. Esse mesmo efeito foi observado por Lin e seus colaboradores em 2010 em um estudo que foi realizado a introdução por transformação da seqüência IS*Aba1-bla_{oxa-66}* em uma cepa de *A. baumannii* sensível, resultando em hiperexpressão da enzima oxa-66.

A seqüência de inserção IS*Aba-1* não esteve relacionada a hiperexpressão no presente estudo em nenhum dos isolados analisados que apresentaram como carbapenemase somente a enzima Oxa-51-*like* (total de 36 isolados), esses isolados apresentaram CIMs relativamente altas para o imipenem e meropenem (CIM₅₀ 64 e 128µg/mL para o imipenem e meropenem respectivamente). Essa alta resistência deve estar relacionada a outros mecanismos como as alterações de membrana externa e hiperexpressão de bombas de efluxo, ou mesmo pela hiperprodução dessa enzima, mas associada à outra seqüência de inserção, como a IS*Aba-9* (Poirel *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2007; Rasmussen e Hoiby, 2006; Bou *et al.*, 2000), não avaliado no presente estudo.

A IS*Aba-9* foi relatada no ano de 2009 por Poirel e colaboradores. Essa seqüência de inserção apresenta 974pb e pertence ao grupo IS982. O isolado analisado por esses autores apresentou altos índices de resistência

ao imipenem e meropenem, que foi correlacionado à presença desse gene adjacente ao gene *bla*_{oxa-51-like}.

No presente estudo apenas um isolado não apresentou o gene *bla*_{oxa-51-like}. Após reação de seqüenciamento, essa amostra foi identificada como *A. calcoaceticus* e apresentou em sua estrutura genômica a presença da seqüência IS_{Aba-1}. A presença dessa seqüência de inserção em outras espécies diferentes de *A. baumannii* já foi relatada por Boo e seus colaboradores no ano de 2009.

Nesse estudo de Boo e colaboradores (2009), a seqüência de inserção estava relacionada com a hiperexpressão da enzima Oxa-23 na geno-espécie 3 de *Acinetobacter*. Outro estudo, de 2005 de Segal e colaboradores, identificaram a presença dessa seqüência na espécie *A. Iwoffi*, mas a mesma não foi relacionada a outros gêneros diferentes de *Acinetobacter*, reforçando assim, que a seqüência de inserção IS_{Aba-1} pode tanto estar presente em outras espécies de *Acinetobacter* como ser responsável pela hiperexpressão de genes de resistência nessas espécies. Essa relação pode ser devido ao fato dessa seqüência estar inserida em plasmídios específicos dessa espécie, sendo improvável a transmissão para outros gêneros (Segal *et al.*, 2005).

A genotipagem através da metodologia de PFGE mostrou que dos nove isolados (correspondendo a 18% do total de amostras estudadas) que apresentaram o gene *bla*_{oxa-51-like/oxa-23-like}, sete (77,8%) desses pertenciam ao mesmo clone, sugerindo assim uma mobilidade horizontal desse gene em nosso hospital. Outro estudo brasileiro de 2010 realizado por Bier e seus

colaboradores também observou essa relação clonal de disseminação do gene *bla*_{oxa-23}, sendo que 99% das amostras que continham esse gene pertenciam a 3 *clusters*. Esse estudo também mostrou que dos 172 isolados resistentes aos carbapenêmicos obtidos de pacientes de um hospital em Curitiba, 100% das amostras continham a presença do gene *bla*_{oxa-23}.

Estes isolados apresentaram CIM variando de 16 a 64µg/mL e de 16 a 128µg/mL para o imipenem e meropenem, estando de acordo com dados apresentados por Feizabadi e colaboradores em 2007, que de um total de 22 isolados mostraram uma variação da CIM de ambos os antimicrobianos de 16 a 256µg/mL.

No Brasil dois outros grupos de autores identificaram a presença do gene *bla*_{oxa23} em surtos hospitalares causados por *Acinetobacter* resistentes aos carbapenêmicos. O primeiro surto foi descrito em Curitiba por Dalla-Costa e colaboradores em 2003. Esse estudo englobou 8 isolados de *Acinetobacter* sp. com concentrações inibitórias mínimas maiores do que 32µg/mL para os antimicrobianos imipenem e meropenem. Em um estudo mais recente em 2009, Carvalho e colaboradores relataram um surto de *Acinetobacter* spp com a presença do gene *bla*_{oxa-23} em 8 hospitais do Rio de Janeiro, e assim como o trabalho anterior a resistência aos antibióticos carbapenêmicos foi muito alta (CIM> 32µg/mL). Esses autores não tentaram identificar a presença de seqüências de inserção provendo a hiperexpressão desse gene e tampouco avaliaram o papel das oxacilinas através da expressão desses genes ou da hidrólise dos carbapenêmicos.

Assim como no Brasil outros surtos de *Acinetobacter* com gene *bla*_{oxa-23} foram descritos em outras partes do mundo. Essa disseminação pelo país e pelo mundo pode ser explicada pela característica desse gene alojar-se em plasmídios, facilitando assim a sua abrangência territorial (Peleg *et al.*, 2009; Boo e Crowley 2009; Queenan *et al.*, 2007).

Um estudo mais recente de 2009 realizado em Porto Alegre pelo grupo de Martins e seus colaboradores, destacou a presença da enzima Oxa-23 como o principal fator que leva a resistência aos isolados estudados. Apesar dessa conclusão, este trabalho não estudou a presença de outros mecanismos de resistência diferentes das enzimas oxacilinases como a presença de enzimas MβL ou mesmo a alteração de porinas de membrana externa e também não averiguou o poder de hidrólise desses isolados.

No presente estudo, das nove amostras que apresentaram o gene de resistência *bla*_{oxa-51-like/oxa-23-like}, o teste Hodge modificado foi positivo em 7 dessas amostras, sendo que as duas amostras que não foram detectadas por esse teste tinham níveis de resistência mais altos para carbapenêmicos dentre todas as amostras em que esse gene foi detectado (CIM – 64/64 e 64/128 µg/mL respectivamente para o imipenem e meropenem). Esse mesmo fato foi observado em 16 isolados dos 36 isolados que apresentaram somente a presença do gene codificador da enzima Oxa-51, essas amostras apresentaram CIM para os carbapenêmicos similares as demais amostras deste estudo.

No presente estudo, quando utilizado a metodologia de hidrólise do imipenem como padrão ouro na análise dessas amostras isoladamente, o

teste de Hodge modificado apresenta uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 40%, mostrando que esse teste pode apresentar uma baixa especificidade na detecção das oxacilinases.

O fato de que poucas amostras apresentaram poder de hidrólise para o imipenem (6 isolados positivos dentre os 28 analisados) sugere um indício de que a baixa sensibilidade desses isolados deve estar relacionada a outros mecanismos de resistência diferentes de carbapenemases.

Para a detecção fenotípica específica das oxacilinases foi utilizada a metodologia de inibição da enzima na presença de NaCl. Apesar do pequeno número de amostras e do pequeno número de clones (3 perfis clonais gerados pela análise do polimorfismo do DNA gerados por PFGE), quando realizada a análise desses resultados comparativamente com os resultados obtidos no teste de hidrólise (padrão ouro) esse teste não se mostrou eficiente para a detecção dessa classe de enzimas nos isolados deste presente estudo mesmo utilizando duas diferentes concentrações para esse inibidor.

No presente estudo, oito dos isolados com a presença do gene codificador da enzima Oxa-23 apresentaram a sequência de inserção *ISAbal-1* logo anterior ao gene *bla_{oxa-23-like}*. Interessantemente, o isolado 73 que possuía níveis de resistência mais elevada (64 e 128µg/mL para imipenem e meropenem respectivamente) foi o único em que não foi detectada a presença dessa sequência de inserção adjacente ao gene codificador dessa oxacilinase. Esse isolado também não apresentou hidrólise para o antimicrobiano imipenem e foi negativo para o teste de Hodge modificado.

Isso provavelmente deve estar relacionado a outros mecanismos de resistência como alterações de membrana externa.

Outras enzimas que foram pesquisadas nesse estudo são as ESBL, embora ainda pouco freqüentes em *Acinetobacter* essas enzimas possuem uma disseminação mundial e já foram descritas em vários países como a Argentina, Coréia, França, Itália, mas até o presente momento essas enzimas não foram identificadas em território nacional em se tratando do gênero *Acinetobacter* (Vahaboglu *et al.*, 2001; Poirel *et al.*, 2003; Celenza *et al.*, 2006; Endimiani *et al.* 2007; Poirel *et al.*, 2007).

A única ESBL descrita até o momento em *Acinetobacter* com relativo poder de hidrólise contra os carbapenêmicos foi identificada em 2007 na Argentina. Esse gene *bla_{sco1}* tem sido localizado em vários isolados de diferentes cidades Argentinas. Mesmo com essa proximidade territorial, o gene *bla_{sco1}* ainda não foi identificado no Brasil (Poirel *et al.*, 2007).

O presente estudo não conseguiu identificar por metodologias fenotípicas a presença dessas enzimas, mesmo com a adição ao teste de inibidores de cefalosporinases cromossomais (AmpC) que não são inibidas pela presença do ácido clavulânico ocasionado falsos negativos (Pitout *et al.*, 2003).

Este estudo também averiguou a presença das carbapenemases KPC e GES. E apesar de alguns autores terem identificado em *Acinetobacter sp.* enzimas da classe A de Ambler, os isolados avaliados neste estudo não apresentaram positividade para esses genes através da PCR utilizando-se

de iniciadores específicos para essas enzimas (Robledo *et al.*, 2010; Moubareck *et al.*, 2009)

Vários testes fenotípicos foram utilizados para a detecção de carbapenemases. Para a detecção das MβL foram utilizadas no presente estudo três metodologias diferentes: Etest[®], DDST e CD.

Quando comparado com uma metodologia “gold standard”, que nesse caso foi a PCR, o Etest[®] apesar de ter mostrado valores de sensibilidade altos, apresentou valores de especificidade muito baixo (8,89%). Segal e Elisha destacaram em 2005, em uma associação com um estudo de Danel e seus colaboradores em 2001, que a anomalia desses resultados pode estar relacionada com a possibilidade de formação de dímeros das enzimas oxacilinases. Essas na forma de dímeros seriam mais ativas contra os antibióticos carbapenêmicos do que quando se apresentam na forma de monômeros. Esse estudo de 2001 mostrou ainda que esses dímeros se tornam estáveis na presença de íons como Zn^{2+} . Então, na presença de um quelante de metal, como o EDTA, esses dímeros voltam à sua forma monômeras sendo menos ativos contra o imipenem ou outro antimicrobiano da classe dos carbapenêmicos. Essa característica leva a resultados falsos positivos.

Segal e colaboradores (2005) relacionaram essa ineficiência da detecção das MβL pela metodologia de Etest[®] pela presença das enzimas Oxa-23. No nosso estudo, no entanto, essa incapacidade da detecção das MβL esteve relacionada não só com a presença das enzimas do grupo Oxa-23 como também do grupo de enzimas intrínsecas Oxa-51.

Comparando as metodologias DDST e CD, os melhores resultados foram observados com a aproximação de disco de imipenem (10µg) com outro disco em branco de contendo 3µL do ácido β-mercaptoetanol não diluído (sensibilidade de 100% e especificidade de 71%).

Um estudo comparativo das metodologias fenotípicas para a detecção de MβL realizado por Picão seus colaboradores em 2008, abrangeu um total de 16 isolados de *Acinetobacter*, sendo 9 produtores de IMP e 1 produtor da enzima SIM, os demais isolados eram controles negativos. Os melhores resultados obtidos para a detecção de MβL foram através da metodologia de DDST com a aproximação do um disco de imipenem com outro disco em branco onde foram aplicados 5µL de ácido mercaptopropionico (1,4mM)(sensibilidade 100% e especificidade 100%). A distância estipulada entre os discos foi de 20mm.

Quando comparados com os dados de Picão (2008) e seus colaboradores, apesar de os dois estudos terem utilizados diferentes derivados de Thiol, a metodologia testada pelo presente estudo apresentou uma menor especificidade para a detecção de MβL, isso provavelmente se deve ao uso do ácido β-mercaptoetanol não diluído o que pode aumentar a sua atividade bactericida (Picão *et al.*, 2008).

Outro mecanismo relacionado com a redução da CIM dos antimicrobianos carbapenêmicos é a diminuição da expressão de porinas ou mesmo a ausência delas (Vila *et al.*, 2007; Bou *et al.*, 2000; Clark, 1996).

Alterações da membrana externa decorrente da diminuição de proteína de 33 a 36 kDa foram demonstradas por Costa e seus

colaboradores (2000). Esse estudo compreendeu a comparação de 3 isolados, antes e após a administração de carbapenêmicos. Essa mesma relação também foi encontrada anteriormente por Clark em 1996, esse autor associou a diminuição dessa proteína à resistência a outros antibióticos como amicacina, tobramicina, ciprofloxacina e a ceftazidima. Em 2005, Tomás e seus colaboradores clonaram o gene dessa OMP e mostraram o real envolvimento dessa proteína com a resistência aos carbapenêmicos.

Em 2002, Limansky e colaboradores evidenciaram em seu estudo que a perda de uma proteína de 29kDa também estava relacionada a resistência ao imipenem, mais tarde essa proteína foi denominado com o nome de *CarO*. Siroy e colaboradores em estudo de 2005 mostraram que essa porina não possuía especificidade para o imipenem, tratando-se então, de um canal não específico pelo qual podem transitar varias substâncias, assim como os antibióticos imipenem e meropenem.

Em 2009, Lu e colaboradores verificaram ao realizar uma PCR para a identificação da porina *CarO* de *Acinetobacter* uma produção de um *amplicon* de tamanho de 1900pb em vez de um de tamanho de 750pb, essa diferença esteve relacionada a presença da seqüência de inserção *ISAbal-1* dentro do gene codificador da proteína *CarO*, esses isolados possuíam CIM para imipenem variando de 64 a 128µg/mL, provavelmente essa inserção resultou em uma impossibilidade da formação dessa porina e diminuindo assim a suscetibilidade ao imipenem.

Dupont e colaboradores em 2005 além de observarem a diminuição da proteína de peso de 29kDa em isolados de *Acinetobacter* resistentes ao

imipenem também detectaram que esses isolados possuíam uma redução na banda de 43kDa, após análise esses autores constaram ser essa proteína homóloga a OprD presente em *P. aeruginosa* é responsável pela entrada de imipenem na célula.

Com base nesses estudos, diferentes clones foram analisados no presente estudo. Observou-se que na maioria dos isolados essas três proteínas estavam diminuídas ou ausentes. A quantidade de isolados nesse estudo foi bem superior às analisadas nos trabalhos relacionados acima, gerando então certa dificuldade e impossibilidade de correlacionar os perfis gerados.

No presente estudo, três isolados apresentaram ausência das proteínas de pesos moleculares de 29kDa e 43 kDa, suas CIM variaram de 32 a 128µg/mL e de 64 a 256µg/mL para o imipenem e meropenem respectivamente, apesar disso, esses isolados apresentaram fracas bandas no gel de eletroforese da corrida de PCR para a detecção do gene codificador da proteína de 33-36kDa. Provavelmente, neste caso, a metodologia de SDS-PAGE não foi capaz de identificar essa quantidade pequena de proteínas, ou mesmo esses genes podem estar presentes, mas não estão sendo expressos. Nesses isolados não foi detectada nenhuma carbapenemase, com exceção da enzima Oxa-51, esse perfil de resistência se repete quando somente uma ou duas dessas proteínas está ausente.

O isolado 25 apresentou CIM similares as apresentadas acima, mas nenhuma alteração de membrana foi observada nesse caso, provavelmente

apontando para a presença de outro mecanismo de resistência que este estudo não conseguiu identificar.

A amostra 30, que apresentou a maior CIM para o imipenem (256µg/mL), apresentou ausência das proteínas de 29kDa e de 43kDa, nesse isolado também foi detectado a carbapenemase IMP-1, mas a hidrólise do imipenem não foi observada

Alguns autores mostraram que a transferência de genes tanto de MβL como de oxacilinas de isolados de *Acinetobacter sp* com resistência para o antimicrobiano para cepas de *E. coli*, não determinou resistência para essas cepas. Concluindo então, que em muitos casos a resistência desses isolados pode estar relacionada a diversos fatores como a não expressão ou mesmo a diminuição da produção de algumas porinas em somatória com as enzimas carbapenemases (Schneider *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2005; Bou *et al.*, 2000).

O presente estudo mostrou assim como os autores supracitados que a resistência do *Acinetobacter* aos carbapenêmicos em sua maioria das vezes está relacionada a presença de vários mecanismos de resistência incluindo carbapenemases e alteração de proteínas da membrana externa. E que a importância do papel das carbapenemases como principal mecanismo de resistência descrito em isolados de *Acinetobacter* resistentes aos carbapenêmicos de hospitais brasileiros precisa ser mais explorada, já que esses genes não estão necessariamente expressos e que a mera detecção da presença desses genes não afasta outros mecanismos de resistência.

CONCLUSÕES

- Foram identificados os genes codificadores para as carbapenemases: *Oxa-51-like*, *Oxa-23-like* e IMP nos isolados de *Acinetobacter* estudados, sendo encontradas proporção de 98%, 18% e 10%, respectivamente para cada enzima.
- Isolados que apresentaram os genes codificadores das carbapenemases IMP/*Oxa-51-like* apresentaram maiores concentrações inibitórias mínimas para o imipenem e meropenem;
- Os isolados analisados foram divididos em dez *clusters* pelo tipagem molecular, sendo o *cluster* A o grupo majoritário (62% dos isolados). As amostras com gene *bla_{imp}* apresentaram uma distribuição não clonal ao contrário das amostras com o gene *bla_{oxa-51/oxa-23 like}* que apresentaram uma distribuição clonal.
- A melhor metodologia fenotípica para detecção de metalo- β -lactamase, dentre as metodologias analisadas, foi a de aproximação de disco de imipenem com um disco de ácido β -merpactoetanol;
- A metodologia de Hodge modificado para a detecção de carbapenemases não apresentou boa especificidade para as amostras analisadas;

- A metodologia de diluição em agar do antimicrobiano Imipenem com o inibidor NaCl para a detecção de oxacilinases não apresentou boa especificidade para as amostras analisadas;
- O gene que codifica a sequência *ISAb_a1* foi identificado na maioria dos isolados, mas em nenhum caso ele foi encontrado na região que antecede o gene *bla_{oxa-51-like}* e não esteve relacionado a hiperexpressão dessas enzimas em nenhum dos isolados que apresentaram como carbapenemase somente a enzima *Oxa-51-like*;
- A sequência de inserção *ISAb_a1* foi encontrada na região que antecede o gene *bla_{oxa-23}* em 8 dos nove isolados que apresentavam esse gene; que apresentaram os genes codificadores das carbapenemases (*Oxa-23* e *IMP*), aventando a possibilidade de que esses genes não estavam expressos.
- As proteínas de membrana externa CarO (29 kDa), proteínas de 33-36 kDa e 43kDa estavam diminuídas ou ausentes nos diferentes clones avaliados. Três isolados apresentaram total ausência dessas proteínas. Demonstrando assim a importância desse mecanismo de resistência.
- Em vários isolados a resistência aos carbapenêmicos esteve relacionada a associação dos mecanismos de resistência decorrentes da alteração de proteínas da ME e presença de carbapenemase.

REFERÊNCIAS

Asensio A, Cantón R, Vaqué J, Calbo-Torrecillas F, Herruzo R, Arribas JL, Sáenz MC; and Grupo de Trabajo EPINE. Prevalence of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain (1999-2005). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26(4):199-204.

Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol*. 2003 Dec;41(12):5407-13.

Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MAD, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.*, Sept. 2005; 43(9): 4382–4390

Bergogne-Bérézin e Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; 9(2):148-65

Bier KES, Luiz SO, Scheffer MC, Gales AC, Paganini MC, Nascimento AJ, Carignano E. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. *Am J Infect Control*. 2010 Jan 31.

Bogaerts P, Cuzon G, Naas T, Bauraing C, Deplano A, Lissior B, Nordmann P, Glupczynski Y. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the blaOXA-23 gene associated with ISAba4 in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Nov;52(11):4205-6

Boo TW, Crowley B. Detection of *bla_{oxa58}* and *bla_{oxa23-like}* in carbapenem-susceptible *Acinetobacter* clinical isolates: should we be concerned? *J Medic Microbiol.* 2009

Boo TW, Walsh F, Crowley B. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital: predominance of *Acinetobacter genomic* species 3. *J Medic Microbiol.* 2009; 58: 209-216.

Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(9):3299-305

Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1556-61.

Bradford, P. A., S. Bratu, C. Urban, M. Visalli, N. Mariano, D. Landman, J. J. Rahal, S. Brooks, S. Cebular, and J. Quale. 2004. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenemhydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clin. Infect. Dis.* 39:55–60.

Bratu S, Landman D, Martin DA, Georgescu C, Quale J. Correlation of antimicrobial resistance with beta-lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Sep;52(9):2999-3005.

Brown, S., and S. Amyes. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57:1–3.

Brown S, Young HK, Amyes SG. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect.* 2005 Jan;11(1):15-23.

Buijs J, Dofferhoff AS, Mouton JW, Wagenvoort JH, van der Meer JW. Concentration-dependency of beta-lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Apr;14(4):344-9.

Bush, K.; Jacoby, G.A.; Medeiros, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(6):1211-33.

Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, ACIMosante G, Perilli M. Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(5):975-8.

Cetinkaya E, Coban AY, Durupinar B. Investigation of the effect of efflux pump inhibitors to MIC values of ciprofloxacin in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus*. *Mikrobiyol Bul.* 2008 Oct;42(4):553-61.

Chau SL, Chu YW, Houang ET. Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Oct;48(10):4054-5.

Chiang DH, Wang CC, Kuo HY, Chen HP, Chen TL, Wang FD, Cho WL, Liu CY. Risk factors for mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection with genotypic species identification. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008; 41(5):397-402.

Chu YW, Chau SL, Houang ET. Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and AdeXYZ in different *Acinetobacter* genomic DNA groups. *J Med Microbiol*. 2006 Apr;55(Pt 4):477-8

Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, Martínez-Martínez L, Bou G, Pachón J; Spanish Group for Nosocomial Infection (GEIH) for the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Nov;11(11):874-9.

Clark RB. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. *J Antimicrob Chemother*. 1996; 38(2):245-51.

Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2005.

Costa SF, Woodcock J, Gill M, Wise R, Barone AA, Caiaffa H, Levin AS. Outer-membrane proteins pattern and detection of beta-lactamases in clinical isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;13(3):175-82.

Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Penteado-Filho SR, Livermore DM, Woodford N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3403-6.

Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P. AdelJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Feb;52(2):557-62.

Dupont M, Pages JM, Lafitte D, Siroy A, Bollet C. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res.* 2005; 4(6):2386-90.

Endimiani A, Luzzaro F, Migliavacca R, Mantengoli E, Hujer AM, Hujer KM, Pagani L, Bonomo RA, Rossolini GM, Toniolo A. Spread in na italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2007; 51(6): 2211-14.

Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of literature. *J Hops Infect.* 2006 Sep;64(1):7-15.

Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M, Soroush S, Mohammadi-Yegane S. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of blaOXA genes among *Acinetobacter* spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Jul;61(4):274-8

Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51(3):565-74.

Fontana C, Favaro M, Minelli S, Bossa MC, Testore GP, Leonardis F, Natoli S, Favalli C. *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates. *BMC Infect Dis.* 2008 Jun 8;8:79

Frempong-Manso E, Raygada JL, DeMarco CE, Seo SM, Kaatz GW. Inability of a reserpine-based screen to identify strains overexpressing efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Apr;33(4):360-3.

Gales AC, Pfaller MA, Sader HS, Hollis RJ, Jones RN. Genotypic characterization of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter spp.* isolated in Latin America. *Microb Drug Resist.* 2004;10(4):286-91.

Gales, A. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-B-lactamase. *J. Antim. Chemotherapy.* 2003; 52: 699-702.

Gales AC, MC Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2003; 45: 77–79.

Garvey MI, Piddock LJ. The efflux pump inhibitor reserpine selects multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains that overexpress the ABC transporters PatA and PatB. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 May;52(5):1677-85.

Gehrlein M, Leying H, Cullmann W, Wendt S, Opferkuch W. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy.* 1991; 37(6):405-12.

Gerner-Smidt, P., I. Tjernberg, and J. Ursing. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* . 1991; 29:277–282

Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *Intern J Antimicrob Agents*. 2008;32(2):106-19.

Girão E, Levin AS, Basso M, Gobara S, Gomes LB, Medeiros EA, Barone AA, Costa SF. Trends and outcome of 1121 nosocomial bloodstream infections in intensive care units in a Brazilian hospital, 1999-2003. *Int J Infect Dis*. 2008 Nov;12(6):145-6.

Gonçalves CR, Vaz TM, Araujo E, Boni R, Leite D, Irino K. Biotyping, serotyping and ribotyping as epidemiological tools in the evaluation of *Acinetobacter baumannii* dissemination in hospital units, Sorocaba, Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2000; 42(5):277-82

Heritier C, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(1):115-8.

Heritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3198-202.

Hu WS, Yao SM, Fung CP, Hsieh YP, Liu CP, Lin JF. An OXA-66/OXA-51 like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Nov;51(11):3844-52.

Ishi J, Nakae T. Lipopolysaccharide promoted opening of the porin channel. *FEBS*. 1993; 320: 251-255

Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, Lee JH, Song JS, Lee SH. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. *J Clin Microbiol*. 2005;43(5):2241-5.

Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Yong D, Woo GJ, Lee JH, Jung HI, Jang KH, Lee SH. Investigation of a nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing PER-1 extended-spectrum β -lactamase in an intensive care unit. *J. Hospital Infection*. 2005; 59: 242-248

Jeong SH, Lee K, Chong Y, Yum JH, Lee SH, Choi HJ, Kim JM, Park KH, Han BH, Lee SW, Jeong TS. Characterization of a new integron containing VIM-2, metallo- beta-lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Feb;51(2):397-400.

Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Nov;11(11):868-73

Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O, Albertí S, Garau M, Pérez JL, Bou G, Oliver A. Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Oct;52(10):3589-96.

Kaufmann, M. E. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications* by Woodford, N. and Johnson, A. P. Ed. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA. 1998; 15: 33-50.

Kim SY, Park YJ, Yu JK, Kim HS, Park YS, Yoon JB, Yoo JY, Lee K. Prevalence and mechanisms of decreased susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 Jan; 51(1):85-91

Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Jul 29;57(10):1486-513.

Lee YT, Turton JF, Wu RC, Chen CP, Cho WL, Huang LY, Siu LK. First identification of blaOXA-51-like in non-baumannii *Acinetobacter* spp. *J Chemother*. 2009 Nov;21(5):514-20.

Lee bK, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *European Society of Clinical Microbiology an Infectious Diseases*. 2001; 7:88-102.

Levin AS, Mendes CM, Sinto SI, Sader HS, Scarpitta CR, Rodrigues E, Sauaia N, Boulos M. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Sao Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1996; 17(6):366-8.

Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(12):4776-8.

Lin L, Ling BD, Li XZ. Distribution of the multidrug efflux pump genes, adeABC, adeDE and adeIJK, and class 1 integron genes in multiple antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* *Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Jan;33(1):27-32.

Livermore DM. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002 Feb;3(2):218-24.

Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1991;78:7-16.

Lu PL, Huang LY, Lian ST, Chang K, Lin CL, Hwang IJ, Chiang WG, Chen YH, Lin SF, Siu LK. How carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. established in a newly constructed hospital. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 May;31(5):463-6. Epub 2008 Mar 24.

Lu PL, Doumith M, Livermore DM, Chen T, Woodford N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;

Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Dec;45(12):3375-80.

Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND Type Efflux Pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* Is Regulated by the AdeRS Two-Component System. 2004; 48 (9): 3298–3304.

Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari AC, Tufik S. Rapid Detection and Identification of Metallo- β -

Lactamase Encoding Genes by Multiplex Real-Time PCR Assay and Melt Curve Analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;45 (2):544-7.

Mendes RE, Castanheira M, Pignatari AC, Gales AC. Metallo- β -lactamases. *J Bras Med Lab.* 2006; 42(2): 103-113.

Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. Ges 11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 18 may 2009

Murray CK, Hospenthal DR. *Acinetobacter* infection in the ICU. *Crit Care Clin.* 2009; 24: 237-48

Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(4):1432-40.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Approved standard M7–A5. NCCLS, Wayne, Pa., 2002.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters: Approved Standard NCCLS M23-A2. NCCLS, Wayne, PA, USA, 1981.

Nemec A, Musílek M, Maixnerová M, De Baere T, van der Reijden TJ, Vaneechoutte M, Dijkshoorn L. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009 Jan;59(Pt 1):118-24.

Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. Dec;6(12): 893-903, 2008.

Pasterán, F., M. Rapoport, A. Petroni, D. Faccone, A. Corso, M. Galas, M. Vazquez, A. Procopio, M. Tokumoto, and V. Cagnoni. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006; 50:3222-4

Peleg AY, Seifert H, Paterson D. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev*. 2008, 21(3): 538-82

Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007;51(6): 2065–2069

Pfaller, M.A. ; Hollis, R.J.; Sader, H.S. Molecular Biology – PFGE Analysis of Chromosomal Restriction Fragments. *In: Isenberg, H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press ed. Washington, ASM Press, 1992. P.p.10.5.c.1-p.10.5.c.11.

Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC. Metallo- β -Lactamase Detection: Comparative Evaluation of Double-Disk Synergy versus Combined Disk Tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-Producing Isolates. *J Clin Microbiol*. 2008;46(6):2028-37.

Pitout JD, Reisbig MD, Venter EC, Church DL, Hanson ND. Modification of the double-disc test for detection of enterobacteriaceae producing Extended spectrum and AmpC β -lactamases. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(8):3933-35.

Pitout JD, Sanders CC, Sanders WE Jr. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative bacilli. *Am J Med*. 1997 Jul;103(1):51-9.

Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P. Overexpression of naturally-occurring *bla*_{oxa-51} gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by a novel insertion sequence IS_{Aba-9}. *Antimicrob Agents Chemother*. 29 June 2009.

Poirel L, Corvec S, Rapoport M, Mugnier P, Petroni A, Pasteran F, Faccone D, Galas M, Drugeon H, Cattoir V, Nordmann P. Identification of the novel narrow-spectrum β -lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. From Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(6): 2179-84

Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Sep;12(9):826-36

Poirel L, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann. Oxa-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 202-208.

Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(8):3542-7.

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

Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Apr;44(4):891-7.

Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Mar;57(3):557-61.

Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(3):557-61.

Qi C, Malczynski M, Parker M, Scheetz MH. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2008 Mar;46(3):1106-9. Epub 2008 Jan 23.

Quale J, Bratu S, Landman D, Heddurshetti R. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin Infect Dis*. 2003; 15;37(2):214-20.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul;20(3):440-58

Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-Hydrolyzing-B-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*.1997; 41(2): 223-232.

Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Nov;60(5):1018-29.

Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 May;44(5):1229-35.

Ridley, A. M. Genomic Fingerprinting by Application of rep-PCR. *In Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications* by Woodford, N. and Johnson, A. P. Ed. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA. 1998; 15: 103-15.

Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter sp.* in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Dec 28.

Ruiz M., Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 1192–1198

Sacha P, Wieczorek P, Hauschild T, Zórawski M, Olszańska D, Tryniszewska E. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*--a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46(2):137 42.

Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25(1):57-61.

Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* 2001; 5(4):200-14.

Segal H, Garny S, Elisha BG. Is ISAb-1 customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiology Letters.* 2005; 425-429.

Segal H, Elisha BG. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 26 July.

Schneider H, Queenan AM, Bauernfeind. Novel carbapenem-hydrolyzing oxacillinase Oxa-62 from *Pandoraea pnomenusa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 1330-1335

Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J. H.; Pfaller, M. A.; Tenover, R.H. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington, DC, ASM press, 2003; p.749-51.

Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5407-13.

Sinha M, Srinivasa H. Mechanism of resistance to carbapenems in meropenem-resistant *Acinetobacter* isolates from clinical samples. *Indian Journal of medical Microbiology.* 2007; 25(2): 121-5

Siroy A, Cosette P, Seyer D, Lemaître-Guillier C, Vallenet D, Van Dorsselaer A, Boyer-Mariotte S, Jouenne T, Dé E. Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *J Proteome Res.* 2006 Dec;5(12):3385-98.

Siroy A, Molle V, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ, Jouenne T, De E. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(12):4876-83.

Slama TG. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care.* 2008; 12(4): S4.

Southern, E.M. & Elder, J.K. Theories of gel electrophoresis of high molecular weight DNA. In: Rickwood, D. & Hames, B.D. *Pulsed Field Gel Electrophoresis – A Practical Approach*. 1st ed. IRL Press at Oxford University Press Inc., NY, 1995; p.1-18.

Spengler G, Martins A, Schelz Z, Rodrigues L, Aagaard L, Martins M, Costa SS, Couto I, Viveiros M, Fanning S, Kristiansen JE, Molnar J, Amaral L. Characterization of intrinsic efflux activity of *Enterococcus faecalis* ATCC29212 by a semi-automated ethidium bromide method. *In Vivo*. 2009 Jan-Feb;23(1):81-7.

Sung JY, Kwon KC, Park JW, Kim YS, Kim JM, Shin KS, Kim JW, Ko CS, Shin SY, Song JH, Koo SH. Dissemination of IMP-1 and OXA type beta-lactamase in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Korean J Lab Med*. 2008 Feb;28(1):16-23.

Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997; 18(6): 426-39.

Tognim MC, Gales AC, Penteado AP, Silbert S, Sader HS. Dissemination of IMP-1 metallo- beta -lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006 Jul;27(7):742-7.

Turton J.F., Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann M.E., Pitt T.L. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla- oxa-51-like carbapenase gene Intrinsic to this species. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(8): 2974-76.

Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt T. The role of IS*Aba-1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 258: 72-77.

Vahaboglu H, Coskunkan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksali I, Kocazeybek B, Tatman-Otkun M, Leblebicioglu H, Ozinel MA, Akalin H, Kocagoz S, Korten V. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol.* 2001;50(7):642-5.

Vila J, Marco F. Interpretative reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002 Jun-Jul;20(6):304-10; quiz 311-2.

Vila J, Ribera A, Marco F, Ruiz J, Mensa J, Chaves J, Hernandez G, Jimenez De Anta MT. Activity of clinafloxacin, compared with six other quinolones, against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Mar;49(3):471-7.

Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Jun;59(6):1210-5.

von Dolinger de Brito D, Oliveira EJ, Abdallah VO, da Costa Darini AL, Filho PP. An outbreak of *Acinetobacter baumannii* septicemia in a neonatal intensive care unit of a university hospital in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2005; 9(4):301-9.

Walsh, T. *et al.* Evaluation of a New Etest for detecting metallo-B-lactamase in routine clinical testing. *J. Clin. Microbiol*, 2002, 40: 2755-9.

Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Oxa-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, 57: 373-383

Wisplinghoff H, Hippler C, Bartual SG, Haefs G, Stefanik D, Higgins PG, Seifert H. Molecular epidemiology of clinical *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU isolates using a multilocus sequencing typing scheme. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 708–715

Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(4):351-3.

Yang SC, Chang WJ, Chang YH, Tsai YS, Yang TP, Juan CW, Shiao MY. Prevalence of antibiotics resistance and OXA carbapenemases genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in central Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Jan 5.

Yang Y, Bhachech N, Bush K. Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 1995 Jan;35(1):75-84.

Zhou H, Pi BR, Yang Q, Song Y, Chen YG, Li L, Zheng S. Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the ISAba1-bla_{oxa-23} genes in Chinese hospital. *Journal of Medical Microbiology*. 2007; 56: 1076-1080.

ANEXO