UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

Prevalência de genes codificadores de carbapenemases em
isolados multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* recuperados
de amostras clínicas de hospitais do Sudeste e Sul do Brasil

Charline Santos Antonio

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

São Paulo
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

Prevalência de genes codificadores de carbapenemases em
isolados multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* recuperados
de amostras clínicas de hospitais do Sudeste e Sul do Brasil

Charline Santos Antonio

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

São Paulo
2010

Charline Santos Antonio

Prevalência de genes codificadores de carbapenemases em
isolados multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* recuperados
de amostras clínicas de hospitais do Sudeste e Sul do Brasil

Comissão julgadora da dissertação
para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
Orientadora/Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2010.

A Deus e à minha mãe com imensa gratidão por terem
tornado possível a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka, pela oportunidade, pelo conhecimento e por sua compreensão nos momentos de dificuldades.

Ao Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman, por ter transmitido gentilmente informações primordiais para o desenvolvimento deste trabalho e pela importante ajuda fornecida, mesmo nos momentos em que se encontrava impossibilitado com suas ocupações.

À banca examinadora de qualificação, composta pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Pignatari e pela Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa, pelas valiosas sugestões.

Às minhas colegas de laboratório Patrícia, Lilian, Lara, Mônica, Mariama pela troca de conhecimentos e companheirismo e à Franciele e Ketrin pela ajuda na execução dos experimentos.

Ao meu querido pai Sarquis pela lição de vida.

À minha amada mãe Conceição pela dedicação, pelos sábios conselhos que me são dados diariamente e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos pelo incentivo.

Ao meu amor pelo apoio de sempre.

À Larissa Terasawa, Carmem Ito, Maria da Rocha Gaspar, Lorena de Brito, Cesar Busato, Maurício Miranda e Maria Rita Elmor de Araujo por fornecerem gentilmente as cepas utilizadas neste trabalho.

Aos funcionários do departamento e da secretaria de pós-graduação, especialmente à Elaine pela colaboração.

ANTONIO, C.S. **Prevalência de genes codificadores de carbapenemases em isolados multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* recuperados de amostras clínicas de hospitais do Sudeste e Sul do Brasil.** São Paulo. 2010. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Acinetobacter baumannii (Ab) é um dos principais agentes de infecção hospitalar, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). A principal característica da bactéria é a sua resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, o que favorece sua persistência no ambiente hospitalar, causando infecções de difícil controle e tratamento. Nos esquemas terapêuticos, os antibióticos carbapenêmicos são os fármacos de escolha, porém nos últimos anos a resistência a estas drogas tem aumentado drasticamente em função da emergência e disseminação de cepas produtora de carbapenemases [i.e., oxacilinases (OXA) e metalo-beta-lactamases (MβL)]. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de enzimas carbapenemases do tipo OXA e MβLs, em 36 amostras multirresistentes de *A. baumannii*, previamente triadas, provenientes de 8 hospitais brasileiros, durante 2004/2008. A caracterização fenotípica e genotípica dos isolados foi realizada por meio da determinação de CIM, hidrólise enzimática e PCR para pesquisa dos genes *bla*_{OXA} e *bla*_{MβL}, assim como seqüências de inserção (ISAba-1, ISAba-3) responsáveis pela mobilização dos determinantes de resistência do tipo *bla*_{OXA}. Finalmente a análise da diversidade genética foi realizada por ERIC-PCR com análise de *clusters* por coeficiente de Dice. Todos os 36 isolados apresentaram 100% de resistência para imipenem (CIM₉₀ > 64 µg/mL), meropenem, ceftazidima, ciprofloxacina e piperacilina/tazobactam, enquanto que os antibióticos com maior atividade *in vitro* foram a ampicilina/sulbactam (61,2%) > tobramicina (61,1%) > gentamicina (47,3%) > amicacina (28%). Em todos os isolados foi confirmada a presença intrínseca dos genes *bla*_{OXA-51} e ISAba-1, não apresentando colinearidade entre eles, enquanto que 41,6% dos isolados carregaram a combinação dos genes ISAba-1/*bla*_{OXA-23} (Genbank accession [FJ628170](#)), um isolado (2,7%) carregou a combinação de genes ISAba3/*bla*_{OXA-58}/ISAba3 (Genbank accession [FJ492877](#)) e dois isolados (5,5%) clonalmente relacionados, carregaram o gene *bla*_{OXA-72} (Genbank accession [FJ969387](#)). Surpreendentemente, em um centro hospitalar foi documentada a presença de um surto de infecção por Ab produtor de OXA-23. Finalmente a tipagem epidemiológica dos isolados revelou a presença de 13 *clusters*, sendo que 8 diferentes *clusters* carregavam o gene *bla*_{OXA-23}. Em resumo, nossos resultados confirmam a disseminação de cepas produtoras de OXA-23 associadas com ISAba-1 no Brasil, assim como a presença intrínseca do gene *bla*_{OXA-51} em Ab. Por outro lado, este é o primeiro relato de isolados carbapenem resistentes carregando os genes *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-72} em hospitais brasileiros, os quais aparentemente surgiram em 2004 e 2008, respectivamente.

Palavras-chave: Infecção hospitalar, *Acinetobacter baumannii*, Resistência.

ANTONIO, C.S. **Prevalence of carbapenemase-encoding genes in isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* recovered from clinical samples of hospitals in the southeast and south Brazil**. São Paulo. 2010. Dissertation (Master) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii (*Ab*) is a leading cause of hospital infection, mainly in intensive care units. The main characteristic of the bacterium is its intrinsic resistance to diverse antimicrobial agents, which contribute to persistence in hospital environments causing infections of difficult control and treatment. In therapeutic schedules, carbapenems are choice antibiotics, however in recent years the resistance to these drugs has increased drastically in function of the emergency and dissemination of carbapenemase-producing isolates [i.e., oxacillinases (OXA) and metallo-beta-lactamases (M β Ls)]. The aim of this work was to evaluate the production of OXA- and M β L-like carbapenemases, in 36 isolates previously screened as multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii*, recovered from 8 Brazilian hospitals, during 2004/2008. Phenotypic and genotypic characterization of MDR *Ab* was carried out using CIM determination, enzymatic hydrolysis and PCR for screening of the *bla*_{OXA}- and *bla*_{M β L}-like genes, and insertion sequences (IS*Aba*-1, IS*Aba*-3) responsible for mobilization of *bla*_{OXA}-like gene cassettes. Analysis of genetic relationship was carried out by ERIC-PCR with analysis of clusters for Dice's coefficient. All of the 36 isolates showed 100% resistance to imipenem (CIM90 > 64 μ g/mL), meropenem, ceftazidime, ciprofloxacin and piperacillin/tazobactam, whereas antibiotics exhibiting a best *in vitro* activity were ampicillin/sulbactam (61.2%) > tobramycin (61.1%) > gentamicin (47.3%) > amikacin (28%). Presence of *bla*_{OXA-51} and IS*Aba*-1 genes was confirmed in all isolates, not presenting collinearity between them, whereas 41.6% isolates carried the IS*Aba*-1/*bla*_{OXA-23} gene array (Genbank accession FJ628170). One *Ab* isolate harbored the IS*Aba*-3/*bla*_{OXA-58}/IS*Aba*-3 gene array (2.7%) (Genbank accession FJ492877) and 5.5% of *Ab* isolates harbored the *bla*_{OXA-72} gene (Genbank accession FJ969387). Surprisingly, an outbreak of infection with MDR *Ab* producing OXA-23 enzyme was documented. Finally the ERIC-PCR typing revealed the presence of 13 clusters, of which 8 different clusters carried the *bla*_{OXA-23} gene. In summary, our results confirm the dissemination of OXA-23-producing *Ab* isolates associated with the IS*Aba*-1 gene, in Brazil, as well as the intrinsic presence of the *bla*_{OXA-51} gene cassette. On the other hand, this is the first report of carbapenem-resistant *Ab* isolates harboring genes *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA-72} recovered in Brazilian hospitals, which most likely emerged in 2004 and 2008, respectively.

Keywords: Hospital infection. *Acinetobacter baumannii*. Resistance.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 O microrganismo.....	01
1.2 Patogenicidade e fatores de risco.....	02
1.3 Epidemiologia.....	04
1.4 Antibioticoterapia.....	08
1.5 Resistência.....	11
1.6 Mecanismos de resistência ao imipenem.....	12
1.6.1 Mecanismos enzimáticos.....	13
1.6.1.1 β -lactamases.....	13
1.6.1.2 Carbapenemases.....	15
1.6.1.2.1 Carbapenemases serina (oxacilinases Classe D).....	17
1.6.1.2.2 Metallo-beta-lactamases.....	23
1.6.1.2.3 Outras beta-lactamases.....	26
1.6.2 Mecanismos não enzimáticos.....	27
1.6.2.1 Alterações nas PBPs e OMPs.....	27
1.6.2.2 Bombas de efluxo.....	29
1.7 Contexto genético.....	30
1.7.1 Sequências de inserção (IS).....	30
1.7.2 Integrons de classe 1.....	32
1.8 Tipagem genotípica.....	33
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Amostras bacterianas.....	36
3.2 Condições de cultura.....	37
3.3 Teste de sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma).....	37
3.4 Concentração inibitória mínima do imipenem.....	37
3.5 Triagem para detecção de carbapenemases (M β L E OXA).....	39
3.5.1 Dupla difusão de disco para detecção de M β L.....	39
3.5.2 Etest® M β L.....	40
3.5.3 Teste de Hodge.....	40
3.6 Extração de DNA.....	41
3.7 Confirmação genotípica de β -lactamases.....	42

3.8 Reação de sequenciamento.....	44
3.9 Transferência dos genes de resistência.....	44
3.10 Tipagem molecular.....	45
3.10.1 ERIC-PCR.....	45
3.11 Quantificação de proteínas.....	45
3.12 Hidrólise enzimática.....	46
4. RESULTADOS	47
4.1 Antibiógrama e determinação da CIM do imipenem.....	47
4.2 Triagem para detecção de carbapenemases (MβL e OXA).....	48
4.2.1 Teste de dupla difusão com disco (TDDD).....	48
4.2.2 Método de Etest® MβL.....	49
4.2.3 Teste de Hodge.....	50
4.3 Detecção genotípica da produção de MβL, OXA e IS.....	50
4.4 Transferência dos genes de resistência.....	51
4.5 Tipagem molecular (ERIC-PCR).....	56
4.6 Hidrólise enzimática.....	58
5. DISCUSSÃO	59
5.1 Considerações gerais.....	59
5.2 Perfil de resistência das amostras aos antimicrobianos.....	60
5.3 Triagem para produção de MβL.....	61
5.4 Teste de Hodge.....	61
5.5 Concentração inibitória mínima (CIM).....	62
5.6 Caracterização de genes <i>bla</i> _{OXA} , IS, <i>bla</i> _{MβL}	62
5.7 Tipagem genética.....	65
5.8 Hidrólise enzimática e inibição pelo NaCl.....	65
5.9 Considerações finais.....	67
6. CONCLUSÃO	69
7. REFERÊNCIAS	71
APÊNDICES	90
ANEXO	102

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ocorrência de <i>A. baumannii</i> produtor de enzimas do tipo OXA em estados brasileiros.....	06
Figura 2. Ilustração dos países que tiveram relatos de surto por <i>A. baumannii</i> resistente aos carbapenems.....	08
Figura 3. Ilustração do Teste de Hodge.....	18
Figura 4. Ilustração da distribuição e contexto genético das enzimas do tipo OXA em <i>Acinetobacter baumannii</i>	23
Figura 5. Representação esquemática do transposon bacteriano composto.....	31
Figura 6. Representação esquemática do integron de classe 1.....	33
Figura 7. Representação esquemática do método da dupla difusão com disco.....	39
Figura 8. Perfil de multirresistência em isolados produtores de OXA-58, OXA-23 e OXA-72.....	49
Figura 9. Ilustração dos resultados do Teste de Hodge.....	50
Figura 10. Reação de polimerase em cadeia para detecção dos genes codificadores das enzimas OXA e das sequências de inserção.....	53
Figura 11. Reação de polimerase em cadeia para detecção dos genes codificadores das enzimas OXA.....	53
Figura 12. Representação esquemática das sequências de inserção em regiões adjacentes aos genes <i>bla</i> _{OXA-like}	54
Figura 13. Representação das sequências de nucleotídeos do GenBank Accession no. FJ628170.....	54
Figura 14. Representação das sequências de nucleotídeos do GenBank Accession no. FJ492877.....	55
Figura 15. Representação das sequências de nucleotídeos do GenBank Accession no. FJ969387.....	55
Figura 16. Resultados da análise do dendrograma.....	57
Figura 17. Perfil de hidrólise do imipenem.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação das β -lactamases.....	Pág. 14
Tabela 2.	Identificação de β -lactamases em <i>Acinetobacter baumannii</i>	16
Tabela 3.	Disseminação de <i>Acinetobacter baumannii</i> produtor de enzimas do tipo OXA em estados brasileiros.....	22
Tabela 4.	Dados de procedência e isolamento das amostras.....	36
Tabela 5.	Alvos a serem amplificados para a detecção de genes <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{MβL} e IS.....	43
Tabela 6.	Sensibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>A. baumannii</i>	48
Tabela 7.	Genes <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{MβL} , e IS identificados em isolados de <i>A. baumannii</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
<i>Bla</i>	gene β -lactamase
BP	Beneficência Portuguesa
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DHP-1	Enzima dehidropeptidase-1
DNA	Acido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR
ESBL	β -lactamases de espectro estendido
HA	Hospital Aviccena
HAM	Hospital Alvorada Moema
HGVP	Hospital Geral Vila Penteado
HJ	Hospital Jaraguá
HRR	Hospital Rudge Ramos
HU	Hospital Universitário
IS	Sequência de Inserção
MR	Multirresistência
MYSTIC	Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection
MβL	Metalo- β -lactamase
OMP	Proteína de membrana externa
OXA	β -lactamase do tipo oxacilinase
pb	pares de base
PBP	Proteínas ligadoras de penicilina
PFGE	Eletroforese em Gel por Campo Pulsado
SCM	Santa Casa de misericórdia
SENTRY	Programa de vigilância epidemiológica
Tn	Transposons
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UV	Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

1.1 O microrganismo

Taxonomicamente, membros do gênero *Acinetobacter* spp. encontram-se agrupados na família *Moraxellaceae*. Morfologicamente *Acinetobacter* spp. são cocobacilos Gram-negativos, não fermentadores de glicose, aeróbios estritos, imóveis, catalase positiva e oxidase negativa. Apresentam as melhores faixas de crescimento entre 20 e 30 °C e raramente reduzem o nitrato. (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996; BOUVET; GRIMONT, 1986). São capazes de resistir ao dessecação e a amplas faixas de temperatura e pH (BROWN; AMYES, 2006; COELHO *et al.*, 2004).

Os membros do gênero *Acinetobacter* podem ser identificados presuntivamente por meio da coloração do Gram, apresentando-se na forma de cocobacilos Gram-negativos ou dispostos como diplococos. Crescem bem em ágar MacConkey, onde formam colônias de coloração levemente rosadas, devido à pouca oxidação da lactose, convexas, translúcidas ou opacas. *Acinetobacter baumannii* é sacarolítico e acidifica a maioria dos carboidratos no meio de oxidação e fermentação (OF), sendo identificado pela produção de ácido a partir da glicose (WINN *et al.*, 2006).

Membros do gênero *Acinetobacter* são saprófitas de vida livre que podem ser facilmente isolados do solo, água, ar e alimentos (CROMBACH *et al.*, 1989; BROOKS; WALCZAK; HAMEED, 2000). Podem, também, ser encontrados no ambiente clínico, onde são isolados como comensais de pele, principalmente das axilas e virilha, da equipe médica e de pacientes (TOWNER, 1997), os quais podem ser considerados os principais reservatórios destas espécies em casos de surtos de infecções hospitalares (GO *et al.*, 1994; MULIN *et al.*, 1995). São encontrados ocasionalmente na cavidade oral e no trato respiratório de indivíduos saudáveis (ROSENTHAL; TAGER, 1975) ou ainda, isolados de urina, fezes e secreções vaginais (MARCHAIM *et al.*, 2007). Apesar de não fazerem parte da microbiota do trato digestivo, estudos realizados por MULIN *et*

al. (1995) e TIMSIT *et al.* (1993) verificaram, com grande frequência, colonizações desses agentes no trato digestivo de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs).

Até o momento, já foram descritas 32 geno-espécies de *Acinetobacter spp.* com base na homologia do DNA. (MURRAY; HOSPENTHAL, 2009; NEMEC *et al.*, 2009). Os grupos 1 (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 3 e 13TU, relatados por TJERNBERG & URSING (1989), são muito semelhantes e recebem a denominação de Complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*, sendo o *Acinetobacter baumannii* a principal espécie associada a surtos de infecções nosocomiais. (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996).

Estes microrganismos são considerados patógenos oportunistas (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996), causando infecções principalmente em pacientes imunocomprometidos (VON GRAEVENITZ *et al.*, 1995).

A principal característica do *Acinetobacter baumannii* é sua resistência intrínseca, apresentam genes de resistência a desinfetantes e antibióticos, o que favorece sua sobrevivência no ambiente (WISPLINGHOFF *et al.*, 2007).

Estes microrganismos propagam-se facilmente de um paciente para outro e, o fato de resistirem à dessecação por longos períodos, poderia explicar sua propensão em causar surtos epidêmicos prolongados (GALES *et al.*, 2001; ZARRILLI *et al.*, 2004).

1.2 Patogenicidade e fatores de risco

As bactérias não fermentadoras podem causar doenças graves em humanos (APPELBAUM; SPANGLER; SOLLENBERGER, 1986). As infecções mais frequentes causadas por *A. baumannii* são pneumonia, septicemia, infecções do trato urinário e meningite secundária. Podem ocorrer, ainda, infecções de pele, de tecido mole (TOWNER, 1997; SCERPELLA *et al.*, 1995; CEFAI *et al.*, 1990) e infecções abdominais (FOURNIER; RICHET, 2006).

O sequenciamento do DNA do *A. baumannii* possibilitou a identificação de genes que favorecem a sua sobrevivência ambiental, como os genes de virulência associados à formação de estruturas de aderência em vidros e plásticos, relacionados com a produção de biofilmes e aderência à célula epitelial humana, além de genes de resistência a desinfetantes e antibióticos (WISPLINGHOFF *et al.*, 2007).

Experimentos *in vitro* identificaram vários fatores relacionados à virulência em *A. baumannii*, tais como a proteína de membrana externa 38 (OMP38), associada à indução de citotoxicidade com consequente apoptose de células epiteliais (CHOI *et al.*, 2008), e os mecanismos de aquisição de ferro, sugerindo a presença de sideróforos (DORSEY; BEGLIN; ACTIS, 2003).

A resistência ao complemento do soro humano deve-se à presença de lipopolissacarídeos e da cápsula exopolissacarídica (JANKOWSKI, 1992), a qual bloqueia o acesso do complemento à parede celular bacteriana e previne a ativação por caminhos alternativos do complemento, sendo o principal fator de virulência, protegendo a bactéria das defesas do hospedeiro (JOLY-GUILLOU, 2005). Mais recentemente, os lipopolissacarídeos do *A. baumannii* têm sido associados com a ativação do sistema imune por indução de uma resposta inflamatória durante pneumonia em modelo murino (KNAPP *et al.*, 2006).

Os fatores de risco associados às infecções causadas por *A. baumannii* são o uso de procedimentos diagnósticos e terapêuticos invasivos, como a ventilação mecânica, o uso de dispositivos, como catéteres intravenosos, urinários e tubos de drenagem (SCERPELLA *et al.*, 1995). Portanto, o tempo prolongado de internação de pacientes em hospitais acaba sendo um fator de risco para aquisição de infecções causadas por *A. baumannii* (CISNEROS; BANO, 2002; KOELEMAN *et al.*, 2001). Além disso, a imunossupressão torna os pacientes mais susceptíveis a estas infecções (VON GRAEVENITZ *et al.*, 1995).

Outros fatores que predispõem a infecções são queimaduras, traumatismos e prematuridade nos neonatos, permanência em unidades em que o *A. baumannii* é endêmico e a hidroterapia usada para tratar pacientes com queimaduras (WISPLINGHOFF; PERBIX; SEIFERT, 1999).

Dados recentes denotam o *Acinetobacter baumannii* como um dos principais patógenos encontrados em infecções de feridas de militares que retornam de confrontos (ARONSON; SANDERS; MORAN, 2006).

Geralmente, os surtos de infecção iniciam-se com a colonização de um paciente susceptível e a subsequente transmissão para outros pacientes internados em um centro médico, sendo as mãos da equipe médica um veículo frequente de transmissão. (VAN DEN BROEK *et al.*, 2006).

O ambiente hospitalar é considerado um importante reservatório para o *A. baumannii* que sobrevive em ambientes secos, podendo ser isolado de vários locais como roupas de cama, cortinas, mobílias e equipamentos. Os pacientes podem ser colonizados por estes microrganismos por períodos prolongados, podendo, muitas vezes, passar despercebidos se o surto não for detectado (VAN DEN BROEK *et al.*, 2006).

1.3 Epidemiologia

Na última década, o *A. baumannii* MR tem sido relatado como o principal patógeno nosocomial em várias partes do mundo, sendo responsável por vários surtos (**Figura 2**) (VILLEGAS; HARTSTEIN, 2003), resultando em aumentos significativos de mortalidade e de custos (ZHOU *et al.*, 2007).

Os estudos de WILSON *et al.* (2004) associaram infecções por *Acinetobacter baumannii* com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30% em pacientes internados em unidade de queimados de um hospital universitário. LEE *et al.* (2005) demonstraram que o *Acinetobacter baumannii* foi o segundo microrganismo mais frequente isolado de culturas de pacientes com pneumonia nosocomial, tendo a maioria ido à óbito após tratamento com terapia inadequada. KWON *et al.* (2007) mostraram um aumento de 44,5% na taxa de mortalidade de pacientes com bacteremia por *Acinetobacter baumannii* resistente ao imipenem que foram tratados com antibióticos inadequados. A utilização indiscriminada de antimicrobianos, além de causar resistência microbiana, tem possibilitado o aumento de morbidade por doenças

infecciosas, especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil (WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Em 1993, foi relatado um surto causado por isolados de *A. baumannii* multirresistentes nas UTIs do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (LEVIN *et al.*, 1996). A partir de então, vários surtos foram relatados em hospitais brasileiros. (COSTA *et al.*, 2000; DALLA-COSTA *et al.*, 2003; GALES *et al.*, 2003a; SADER *et al.*, 2005a; VON DOLINGER *et al.*, 2005; ANTONIO *et al.*, 2008a; ANTONIO *et al.* 2008b; CARVALHO *et al.*, 2009). Estudos multicêntricos têm mostrado que o *A. baumannii* está entre as principais espécies associadas a infecções hospitalares no Brasil. A ordem de frequência varia de acordo com o tipo de estudo. O SENTRY, um programa mundial e longitudinal de vigilância em resistência a antimicrobianos, relatou no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2001 que o Brasil apresentou o maior número de isolados de *Acinetobacter spp.* (n = 400) associados à infecção na América Latina, sendo o percentual de resistência ao imipenem de 8,5% (TOGNIM *et al.*, 2004). Nos estudos de SADER *et al.* (2005a), o Brasil apresentou uma prevalência de isolados resistentes aos carbapenens que variou de 6% a 11%. Já o MYSTIC, que promove dados de vigilância antimicrobiana em UTIs do Brasil, estudando UTIs de sete grandes centros brasileiros, relatou uma taxa de resistência ao imipenem em *A. baumannii* de 10,4% em 2002 (MENDES *et al.*, 2005). Infelizmente, estes microrganismos têm se tornado endêmicos em vários hospitais (MANIKAL *et al.*, 2000).

Figura 1. Ocorrência de infecções por *A. baumannii* produtores de OXA-23 em estados brasileiros. *Prevalência de isolados de *A.b* produtores de OXA-23, OXA-58 e OXA-72. Fonte: DALLA-COSTA *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2009; MOSTACHIO *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2009; LINCOPAN *et al.*, 2010; ANTONIO *et al.*, 2010; SCHIMITH BIER *et al.*, 2010.

Vários surtos de infecção têm sido causados por *Acinetobacter spp.* resistentes a várias classes de antibióticos, como imipenem (GO *et al.*, 1994), cefalosporinas (SCERPELLA *et al.*, 1995; MULIN *et al.*, 1995), fluoroquinolonas (VILLERS *et al.*, 1998) e amicacina (BUISSON *et al.*, 1990).

Em um estudo de caso-controle realizado em um hospital na Turquia em 2004, todos os pacientes que apresentaram infecções nosocomiais por *Acinetobacter baumannii* demonstraram que a ocorrência desse tipo de infecção esteve relacionada à permanência do paciente no hospital e que esta ocorrência poderia ser favorecida pelo uso prévio de antibióticos e, ainda, por

múltiplos processos invasivos, como o uso de tubos endotraqueais, catéteres intravenosos, ventriculares ou urinários (JOLY-GUILLOU, 2005).

SMOLYAKOV *et al.* (2003) demonstraram que a terapia prévia com aminoglicosídeos e a admissão em Unidades de Terapia Intensiva estiveram associadas com a multirresistência nesta espécie. Já nos estudos de LEE *et al.* (2003), a exposição prévia às cefalosporinas de terceira geração e ao imipenem foram fatores de risco para a ocorrência de resistência em infecções nosocomiais. DEL MAR TOMAS *et al.* (2005) relataram que a administração de imipenem como monoterapia foi um fator de risco para colonização e infecção por *A. baumannii* multirresistente.

As manifestações clínicas nas infecções nosocomiais causadas por *Acinetobacter baumannii* variam de acordo com os estudos realizados. Nos estudos de WISE & TOSOLINI (1990), casos de infecções do trato urinário foram associados com o uso de catéteres e foram mais frequentes em centros de reabilitação do que em UTIs. SIEGMAN-IGRA *et al.* (1993) relataram casos de meningite entre os pacientes que fizeram neurocirurgias. Nos estudos de CISNEROS *et al.* (1996), pneumonia e infecções de corrente sanguínea estiveram associadas com uma morbimortalidade consideravelmente elevada (52%). Já os estudos de DAVIS *et al.* (2005) demonstraram que as infecções de ferida têm ocorrido principalmente em pacientes que apresentam queimaduras severas ou traumatismos.

De acordo com a epidemiologia da resistência bacteriana, podem ocorrer variações local, nacional e mundial. Geralmente os surtos envolvem poucos pacientes e a prevalência da resistência é mais elevada em unidades de terapia intensiva (LIVERMORE, 2003).

Podem ocorrer variações no perfil de resistência entre países ou continentes (LIVERMORE, 2003) e mesmo entre hospitais e entre unidades de um hospital. Isso enfatiza a importância da vigilância local na determinação da terapia mais adequada (CISNEROS; BANO, 2002) e a implementação de medidas de controle de infecção (FALAGAS; BLIZIOTIS; SIEMPOS, 2006).

Segundo MARCHAIM *et al.* (2007), os integrantes da Reunião Internacional para o Estudo e Prevenção da Resistência Antimicrobiana Emergente definiram as infecções por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos como um evento de sentinela global, exigindo rápidas intervenções epidemiológicas e microbiológicas.

Figura 2. Ilustração dos países que tiveram relatos de surto por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos. Em vermelho, surtos relatados antes de 2006 e em amarelo surtos relatados após 2006. Fonte: PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008.

1.4 Antibioticoterapia

As infecções por *Acinetobacter baumannii* são de difíceis controle e tratamento, devido à sua capacidade de sobrevivência ambiental prolongada e à sua habilidade em desenvolver resistência a múltiplos agentes antimicrobianos (CISNEROS; RODRIGUES-BANO, 2002; CISNEROS *et al.*, 2005).

A descoberta do *Streptomyces cattleya* e de seus produtos, no final da década de 70, originou uma classe de antimicrobianos β -lactâmicos, denominados carbapenêmicos, que agrupam compostos que variam na estrutura química, na estabilidade à ação de β -lactamases e no espectro de ação (MOELLERING; ELIOPOULOS; SENTOCHNIK, 1989). São considerados terapia

de escolha para o tratamento de infecções por *A. baumannii* devido à sua estabilidade, espectro de ação, pouca resistência associada e poucos efeitos adversos (NICOLAU, 2008).

O imipenem foi o primeiro antibiótico do grupo dos carbapenêmicos a ser introduzido na prática médica, apresentando-se estruturalmente como uma amidina derivada da tianomicina com substituições nos grupos metila, favorecendo a atividade bactericida e a estabilidade contra enzimas β -lactamases. Devido à sua rápida degradação pela enzima dehidropeptidase-1 (DHP-1), localizada nos túbulos renais, torna-se necessária a administração combinada com um inibidor de DHP-1 como a cilastatina, em uma proporção de 1:1 (ZHANEL *et al.*, 2007).

Posteriormente, surgiram o meropenem e o ertapenem, drogas que apresentam maior estabilidade para a DHP-1, permitindo a administração sem cilastatina. O imipenem e o meropenem são a terapia de escolha nos casos de infecções hospitalares e apresentam um amplo espectro de ação *in vitro*. O ertapenem é mais utilizado nos casos de infecções comunitárias e apresenta um espectro de ação mais reduzido que os anteriores, além de ser menos eficaz para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos não fermentadores. O doripenem tem sido recentemente estudado, apresenta atividade mais potente contra *Pseudomonas aeruginosa* e um amplo espectro de ação (ZHANEL *et al.*, 2007). Infelizmente, estudos *in vitro* mostraram que este antimicrobiano não foi eficiente contra infecções causadas por *A. baumannii* que apresentavam os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{IMP-4} (MUSHTAQ; GE; LIVERMORE, 2004).

Os antibióticos carbapenêmicos agem inibindo a atividade das transpeptidases e das D-alanina carboxipeptidases das *Penicillin Binding Protein* (PBPs), impedindo a síntese da parede bacteriana. A sua elevada afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina do tipo 2 (PBP2) e a sua estabilidade diante da degradação por beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) e cromossômicas do tipo AmpC tornam essa classe de antibióticos uma importante opção terapêutica. São utilizados em infecções intra-abdominais complicadas, pneumonias nosocomiais e comunitárias, infecções de pele,

meningites, sepsis e em casos de febre neutropênica (RODLOFF; GOLDSTEIN; TORRES, 2006).

A frequente ocorrência de resistência aos antibióticos carbapenêmicos tem ameaçado os tratamentos bem sucedidos de infecções por *Acinetobacter spp.* (TOMAS *et al.*, 2005; MANIKAL *et al.*, 2000; CORBELL *et al.*, 2000; FIEROBE *et al.*, 2001). Como não há ofertas de novos antibióticos com um espectro de atividade similar ou superior ao imipenem, o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes restringe-se ao uso de antibióticos sem seletividade, como as polimixinas (polimixina B e colistina) (LEVIN *et al.*, 1999), as quais têm sido utilizadas desde o início dos anos 50 (SNAVELY; HODGES, 1984).

Estudos clínicos não randomizados demonstraram sucesso no tratamento contra estas infecções utilizando polimixina ou ampicilina/sulbactam, porém o primeiro pode causar efeitos adversos nocivos como nefrotoxicidade, neurotoxicidade e bloqueio neuromuscular. O segundo apresentou boa atividade *in vitro* e tem sido usado com sucesso contra infecções causadas por *A. baumannii* resistente ao imipenem, tendo boa tolerância e efeitos adversos menos nocivos que o anterior (WOOD *et al.*, 2002; EVANS; FEOLA; RAPP, 1999).

A emergência em relação aos isolados de *Acinetobacter* multirresistentes às drogas tem sido motivo de buscas por novas alternativas terapêuticas (WOOD *et al.*, 2003 e LEVIN *et al.*, 1999). A tigeciclina, um derivado da tetraciclina, pertencente à classe das glicilciclinas, tem sido usada como nova alternativa terapêutica (LIVERMORE; WOODFORD, 2006) e tem apresentado excelente atividade *in vitro* contra isolados de *A. baumannii* (MIC₉₀ 2 mg/L) (HENWOOD *et al.*, 2002). Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado resistência de *A. baumannii* a este antimicrobiano (MIC₉₀ 32 mg/L) (NAVON-VENEZIA; LEAVITT; CARMELI, 2007).

1.5 Resistência

Um dos fatores de grande relevância que tem contribuído para o aumento de linhagens resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos, favorecendo o aparecimento de surtos, é o uso extensivo de terapia antimicrobiana em hospitais, incluindo β -lactâmicos de amplo espectro, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (KOELEMAN *et al.*, 1997; ZARRILLI *et al.*, 2004).

O aumento da resistência aos antimicrobianos em diversas espécies de Gram-negativos, inclusive em *Acinetobacter baumannii*, tem levado à utilização dos carbapenêmicos como antimicrobianos de primeira escolha, porém vários relatos, como os de DALLA-COSTA *et al.*, 2003, têm demonstrado que a resistência ao imipemem tem aumentado rapidamente e que os isolados são frequentemente multirresistentes.

Testes de sensibilidade aos antimicrobianos indicam que as bactérias não fermentadoras apresentam aspectos fisiológicos e bioquímicos diferentes em relação às enterobactérias (APPELBAUM *et al.*, 1982, APPELBAUM *et al.*, 1986; FASS; BARNISHAN, 1980, VON GRAEVENITZ, 1995; HOBAN *et al.*, 1993). Apesar das mudanças na taxonomia destes microrganismos dificultarem as análises dos testes de sensibilidade (VON GRAEVENITZ, 1995), estes ainda são essenciais para o monitoramento dos pacientes com infecções por bacilos Gram-negativos não-fermentadores resistentes aos antimicrobianos e para o desenvolvimento de novos antimicrobianos de amplo espectro.

O gênero *Acinetobacter spp.* dispõe de mecanismos intrínsecos de resistência a todas as classes de antibióticos existentes, além de terem uma capacidade enorme de adquirir novos determinantes de resistência (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996).

Há mais de 25 anos, foi descrito que o *Acinetobacter spp.* pode adquirir fatores de resistência por meio da conjugação de plasmídeos (GOLDSTEIN *et al.*, 1983, MURRAY; MOELLERING, 1980).

1.6 Mecanismos de resistência ao imipenem

A resistência ao imipenem pode resultar da modificação do alvo do antimicrobiano ou do desvio de função daquele alvo, pode ainda ser causada por impermeabilidade, efluxo ou inativação enzimática. Todos os membros de uma espécie podem ser resistentes. Estes mecanismos podem ser intrínsecos (i.e., *Stenotrophomonas maltophilia*) ou podem aparecer por seleção de espécies, mutação ou transferência de DNA. A seleção de espécies altera a importância relativa dos diferentes patógenos, enquanto a mutação e a transferência de DNA conferem resistência a espécies previamente sensíveis (LIVERMORE, 2000; LIVERMORE, 2003).

Em geral, nos bacilos Gram-negativos, os mecanismos de resistência aos antibióticos carbapenêmicos são:

- Impermeabilidade associada à produção de enzimas do tipo AmpC e/ou ESBLs (PAVEZ *et al.*, 2008);
- Impermeabilidade associada à superexpressão de bombas de efluxo (MAGNET *et al.*, 2001);
- Aquisição de enzimas do tipo metalo-beta-lactamases, i.e., IMP, VIM, SPM, GIM, AIM, SIM (YOUNG *et al.*, 2007; WALSH *et al.*, 2005);
- Aquisição de outras carbapenemases não metalo-beta-lactamases, do tipo serina, i.e., OXA e KPC (LIVERMORE *et al.*, 2006; ANTONIO *et al.*, 2008b, PAVEZ; LINCOPAN; MAMIZUKA, 2008);
- Perda ou modificação de porinas (proteína CarO) (LIMANSKY *et al.*, 2002);
- Mais raramente, redução na expressão das PBPs. (FERNANDEZ-CUENCA *et al.*, 2003).

1.6.1 Mecanismos enzimáticos

1.6.1.1 β -lactamases

As β -lactamases são enzimas que hidrolisam o anel beta-lactâmico dos antibióticos, destruindo seu sítio ativo e impedindo sua atividade. Caracterizam-se por sua capacidade de inibir determinados subgrupos de beta-lactâmicos, por isso algumas subclassificações as denominam penicilinasas, cefalosporinasas ou carbapenemases, dependendo da família de beta-lactâmicos que tenha maior sensibilidade pela enzima (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

A classificação das β -lactamases foi definida de acordo com duas propriedades: funcional e molecular (**Tabela 1**).

De acordo com a classificação funcional de BUSH, JACOBY & MEDEIROS (1995), dividem-se em quatro grupos que variam de 1 a 4, apresentando subgrupos nos grupos 2 e 3, os quais são diferenciados de acordo com o substrato específico e perfil inibidor.

De acordo com a classificação molecular, dividem-se em A (penicilinasas – ESBLs, TEM-1, SHV-1, SHV), B (metaloenzimas – M β LS), C e D (oxacilinasas – OXAs), baseada na homologia da sequência dos aminoácidos (AMBLER *et al.*, 1980). Aquelas que pertencem às classes A, C e D são serina β -lactamases que possuem o aminoácido serina no sítio ativo e as que pertencem à classe B são metalo- β -lactamases (M β LS) que possuem um ou dois íons zinco no sítio ativo (JIN *et al.*, 2004).

Tabela 1. Classificação das β -lactamases

β-LACTAMASES				
Classificação BUSH, JACOBY, MEDEIROS, 1995		Classificação AMBLER, 1989	Características	Representantes
Grupo Funcional	Subgrupos maiores	Classe molecular		
1		C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais produzidas por bactérias Gram-negativas. Conferem resistência a todos os β -lactâmicos, exceto carbapenems. Não são inibidas pelo ácido clavulânico.	MIR-1, ACT-1, FOX
2	Inibidas pelo Ácido Clavulânico			
	2 ^a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus spp.</i> e <i>Enterococcus spp.</i> Conferem altos níveis de resistência à penicilina.	Penicilinas de Gram-positivas
	2b	A	β -lactamases de amplo espectro de bactérias Gram-negativas.	TEM-1, SHV-1
	2be	A	β -lactamases de espectro estendido, conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos (ESBLs).	ESBL
	2br	A	β -lactamases resistentes aos inibidores de β -lactamases.	Enzimas derivadas da TEM (IRT) e uma enzima derivada de SHV
	2c	A	Enzimas que hidrolisam carbenicilina.	PSE
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina), possuem pouco efeito contra carbenicilina. São levemente inibidas pelo ácido clavulânico.	Oxacilinas
	2e	A	Cefalosporinas que podem hidrolisar os monobactams.	-
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenems. Possuem uma serina no seu sítio ativo.	SME
3	3a, 3b, 3c	B	Conferem resistência aos carbapenems e todos os tipos de β -lactâmicos com exceção de monobactams. Não são inibidas pelo ácido clavulânico. São zinco-dependentes e são inibidas por EDTA.	Metalo-beta-lactamases
4		ND	Penicilinas miscelâneas não sequenciadas, não categorizadas em nenhum dos grupos detalhados. Não são inibidas pelo ácido clavulânico.	-

Fonte: Adaptado de BUSH, JACOBY E MEDEIROS, 1995. ND: Não determinadas.

1.6.1.2 Carbapenemases

O tratamento de infecções por *Acinetobacter baumannii* com antibióticos carbapenêmicos está sendo comprometido devido à produção de carbapenemases que são capazes de hidrolisar não apenas os carbapenens, mas outras penicilinas e cefalosporinas (QUEENAN; BUSH, 2007).

De acordo com a classificação das β -lactamases, as carbapenemases são encontradas nos grupos 2f e 3. Estas enzimas não conseguem ser inibidas pela maioria dos inibidores de β -lactamases (QUEENAN; BUSH, 2007).

Em *A. baumannii*, a resistência aos antibióticos carbapenêmicos ocorre principalmente devido à produção de carbapenemases de classe B (metalo-beta-lactamases) e classe D (oxacilinases) (LIVERMORE, 2002). Estas enzimas são geneticamente pouco relacionadas, mas compartilham características hidrolíticas semelhantes a outras beta-lactamases (YAN *et al.*, 2006).

Mais recentemente, uma ESBL de classe A, a GES-11, foi associada com resistência aos carbapenens em *A. baumannii* (MOUBARECK *et al.*, 2009). De fato, atualmente, algumas variantes GES são consideradas carbapenemases. (QUEENAN; BUSH, 2007).

Tabela 2. Identificação de β -lactamases em *Acinetobacter baumannii*

β -lactamases	Classe	Localização do gene	Origem geográfica
IMP-1	B	plasmídeo	Itália, Japão, Coreia do Sul
IMP-2	B	plasmídeo	Itália, Japão
IMP-4	B	ND	Hong Kong
IMP-5	B	cromossomo ¹	Portugal
IMP-6	B	ND	Brasil
IMP-11	B	ND	Japão
VIM-2	B	plasmídeo	Coreia do Sul
SIM-1	B	cromossomo ²	Coreia do Sul
OXA-23	D	plasmídeo	Reino Unido, Brasil , Iraque, Polinésia, Colômbia ⁷ , Argentina ⁷
OXA-24	D	cromossomo	Espanha
OXA-25	D	cromossomo	Espanha
OXA-26	D	cromossomo	Espanha
OXA-27	D	ND	Singapura
OXA-40	D	plasmídeo ³ cromossomo	França, Espanha, Portugal
OXA-58	D	plasmídeo cromossomo	França, Espanha, Itália, Grécia, Reino Unido, Áustria, Romênia, Iraque, Argentina, Venezuela, Kuwait, Brasil
OXA-72	D	plasmídeo	Tailândia ⁴ , China ⁴ , Taiwan ⁴ , Coreia do Sul ⁵ , Brasil
OXA-143 ^{6,8}	D	plasmídeo	Brasil

Nota: Adaptado de POIREL & NORDMANN, 2006; Referências: ¹DA SILVA *et al.*, 2002; ²LEE *et al.*, 2005. ³GROSSO; QUINTEIRA; PEIXE, 2009; ⁴LU *et al.*, 2009; ⁵LEE *et al.*, 2009; ⁶HIGGINS *et al.*, 2009; ⁷HIGGINS *et al.*, 2010; ⁸ANTONIO *et al.*, 2010. ND: Não determinado.

1.6.1.2.1 Carbapenemases serina (oxacilinases classe D):

As oxacilinases (OXA) formam um grupo heterogêneo de acordo com suas propriedades estruturais e bioquímicas (NAAS; NORDMANN, 1999). Apresentam em seu sítio ativo um grupamento serina. São assim chamadas por serem capazes de hidrolisar a oxacilina de maneira mais eficiente e rápida que as penicilinas clássicas como a benzilpenicilina. São também capazes de hidrolizar o imipenem, porém nem sempre o meropenem (NORDMANN; POIREL, 2002).

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do imipenem, em *A. baumannii* produtor de carbapenemases do tipo OXA, são geralmente superiores a 8 µg/ml (HÉRITIER *et al.*, 2005c). Algumas destas enzimas são inibidas por NaCl e em sua maioria, resistem à inibição por clavulanato e tazobactam (WALSH *et al.*, 2005).

Para detectar penicilinases em várias espécies de bactérias, HODGE, CIAK & TRAMONT (1978) desenvolveram um teste fenotípico, o qual tem sido modificado para favorecer a detecção de carbapenemases. Nas modificações do teste de Hodge original para pesquisa de carbapenemases, a cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* tem sido substituída pela cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* e o disco de penicilina trocado por um disco de imipenem (LEE *et al.*, 2001). O teste consiste em semear uma suspensão na escala 0,5 de Mcfarland da cepa ATCC em placa com ágar Mueller-Hinton, colocando o disco do antibiótico no centro da placa e estriando a amostra teste, do centro para a periferia da placa (LEE *et al.*, 2001) (**Figura 3**). Este teste tem sido utilizado para a detecção de carbapenemases em isolados de *Acinetobacter baumannii* e tem apresentado positividade em cepas produtoras de enzimas do tipo OXA, como ocorreu nos estudos de LOPEZ-OTSOA *et al.* (2002) e CANDUELA *et al.* (2006), nos quais todos os isolados que apresentavam o gene *bla_{OXA-40}* foram positivos para este teste.

Legenda:

A, C: Presença de distorção na zona de inibição de amostras resistentes ao imipenem.

B, D: Ausência de distorção na zona de inibição de amostras sensíveis ao imipenem.

Figura 3. Ilustração do Teste de Hodge.
Fonte: LEE *et al.*, 2001.

As beta-lactamases da Classe D, em geral não são inibidas por ácido clavulânico, tazobactam ou sulbactam, ao passo que sua atividade pode ser inibida *in vitro* por cloreto de sódio (NaCl). Esta propriedade não é compartilhada por beta-lactamases de outras classes, assim pode-se defini-la como característica útil para a identificação *in vitro* de enzimas desta classe. Em teoria, uma concentração de 100 mM de NaCl pode inibir a atividade de enzimas beta-lactamases de classe D. Esta propriedade não é claramente explicada, porém, estudos recentes têm demonstrado que a sensibilidade ao NaCl por estas enzimas estaria associada com a presença de um resíduo Tyr na posição 144 da estrutura proteica da enzima. De fato, oxacilinasas que apresentam uma mutação Phe144Tyr são resistentes à inibição por NaCl (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010).

As oxacilinasas de classe D possuem mais de 150 variantes já descritas (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010), divididas em nove subgrupos com base na sequência de aminoácidos, porém apenas cinco foram identificados em *Acinetobacter spp* (BROWN; AMYES, 2006).

O grupo 1 é constituído pelas enzimas OXA-23, OXA-27 e OXA-49 (AFZAL-SHAH; WOODFORD; LIVERMORE, 2001). Estas enzimas são codificadas por genes correspondentes ao grupo *bla*_{OXA-23}-like (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

A identificação da primeira carbapenemase, a OXA-23, ocorreu em 1985 na Escócia (SCAIFE *et al.*, 1995), antes mesmo da aprovação dos antibióticos carbapenêmicos para uso geral, levando alguns autores a sugerir que o uso clínico do imipenem não foi responsável pela evolução das carbapenemases de classe A e D, pois estas enzimas já estariam presentes nestes microrganismos. Esta enzima foi inicialmente chamada ARI-1, somente após caracterizações genéticas e bioquímicas, passou a se chamar OXA-23, sendo encontrada em um plasmídeo (DONALD *et al.*, 2000).

No Brasil, a enzima OXA-23-like tem sido responsável pelo fenótipo de multirresistência em isolados hospitalares de *Acinetobacter baumannii* em São Paulo, no Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Minas Gerais (MOSTACHIO *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2009; LINCOPAN *et al.*, 2010), assim como em surtos de infecção em Curitiba (DALLA-COSTA *et al.*, 2003) e Ponta Grossa (ANTONIO *et al.*, 2008a, ANTONIO *et al.*, 2008b).

O segundo grupo compreende as enzimas OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 e OXA-72 (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006; HÉRITIER *et al.*, 2003; LU *et al.*, 2009). Estas enzimas são codificadas por genes correspondentes ao grupo *bla*_{OXA-24}-like (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). A OXA-72 teve seu primeiro relato em amostras de *Acinetobacter baumannii* na Tailândia em 2004 (LU *et al.*, 2009).

O terceiro grupo compreende as carbapenemases tipo OXA-(51, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 78, 79, 80 e 82) (BROWN; AMYES, 2005; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008), constituindo o maior grupo de oxacilinases. Este grupo de enzimas é codificado por genes agrupados no complexo *bla*_{OXA-51}-like (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Recentemente uma nova variante deste grupo foi descrita na Croácia, a OXA-107, estando associada com a sequência de inserção IS*Aba*-1 na sua região anterior (GOIC-BARISIC *et al.*, 2009).

A OXA-51 é codificada intrinsecamente em *A. baumannii* por ser parte natural do cromossomo. Esta enzima tem sido estudada para elucidação da sua atividade enzimática, visto que a expressão do gene que a codifica resulta em uma pobre atividade eletrolítica, justificando a frequência de isolados clínicos sensíveis ao imipenem (HÉRITIER *et al.*, 2005a; BROWN; YOUNG; AMYES, 2005). Porém, foi demonstrado que a migração da sequência de inserção IS_{Aba-1} para a região *upstream* do gene *bla*_{OXA-51} pode promover uma superexpressão deste gene, reduzindo desta maneira a sensibilidade do *Acinetobacter baumannii* aos antibióticos carbapenêmicos (TURTON *et al.*, 2006).

O quarto grupo é representado pela carbapenemase OXA-58 (POIREL *et al.*, 2005b), codificada por um gene pertencente ao complexo *bla*_{OXA-58-like} (PELEG *et al.*, 2008). A OXA-58-like teve seu primeiro relato em isolado de *Acinetobacter baumannii*, na França, em 2003 (POIREL *et al.*, 2005b). Esta enzima tem sido reportada mundialmente (MARQUE *et al.*, 2005; HÉRITIER *et al.*, 2005b; PELEG *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2006; ANTONIO *et al.*, 2009; ANTONIO *et al.*, 2010).

O quinto grupo é representado pela OXA-143, codificada por um gene plasmidial. Foi detectada em *A. baumannii*, isolado em 2004 de amostras clínicas provenientes de uma UTI no Brasil. Sua sequência de aminoácidos apresentou 88% de homologia com a OXA-40, 63% com a OXA-23 e 52% com a OXA-58. A OXA-143 não esteve associada com sequências de inserção (HIGGINS *et al.*, 2009).

Os genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-58-like} podem estar associados com a presença de sequências de inserção (IS) em regiões adjacentes (SHELBURNE *et al.*, 2008; DONALD *et al.*, 2000). Estes elementos de mobilização, quando estão localizados na região *upstream* do gene *bla*_{OXA}, fornecem um promotor transcricional que regula a expressão destes genes (CORVEC *et al.*, 2007; POIREL; NORDMANN, 2006b), promovendo uma superexpressão destes (KATO *et al.*, 2003; POIREL; DECOUSSER; NORDMANN, 2003; SEGAL; ELISHA, 2005).

Estudos realizados em isolados de um hospital Universitário em Houston, Texas, o qual participa do Programa de Vigilância Antimicrobiana do SENTRY, verificaram a associação de *bla*_{OXA} com as sequências de inserção (IS) IS*Aba*- (1, 2, e 3) e constataram que todos os genes *bla*_{OXA-58} estavam localizados na região *downstream* da IS*Aba*-3, enquanto o gene *bla*_{OXA-24} não esteve associado com nenhuma das sequências de inserção testadas. A IS*Aba*-1 esteve associada com o *bla*_{OXA-51}, o que pode ter contribuído para o aumento da CIM de carbapenems (SHELBURNE *et al.*, 2008).

O contexto genético de *bla*_{OXA-23}-like, caracterizado por DONALD *et al.* (2000), foi investigado por meio de seqüenciamento do DNA e constatou-se que a sequência situada na região *upstream* do gene foi 99,3% idêntica à sequência de inserção IS*Aba*-1, descrita por SEGAL, THOMAS & ELISHA (2003).

Investigações genéticas identificaram o gene *bla*_{OXA-58} em regiões adjacentes às sequências de inserção IS*Aba*-2, IS*Aba*-3 e IS18, pertencentes respectivamente às famílias IS3, IS1, IS18 (TURTON *et al.*, 2006; POIREL; NORDMANN, 2006b).

Segundo POIREL & NORDMANN (2006b), o gene *bla*_{OXA-40}, pertencente ao grupo *bla*_{OXA-24}-like, não esteve associado com nenhum elemento de mobilização, tais como sequências de inserção, transposons ou integrons.

Tabela 3. Disseminação de *Acinetobacter baumannii* produtor de enzimas do tipo OXA em estados brasileiros

β -LACTAMASES	ANO	ESTADO	REFERÊNCIA
OXA-23	1999	PARANÁ	DALLA-COSTA <i>et al.</i> , 2003
OXA-23	2002-2008	SÃO PAULO	MOSTACHIO <i>et al.</i> , 2009
OXA-143	2004	-	HIGGINS <i>et al.</i> , 2009
OXA-58	2004	SÃO PAULO	ANTONIO <i>et al.</i> , 2010
OXA-23	2004-2008	RIO GRANDE DO SUL	MARTINS <i>et al.</i> , 2009
OXA-23	2006-2007	RIO DE JANEIRO	CARVALHO <i>et al.</i> , 2009
OXA-72	2007	SÃO PAULO	ANTONIO <i>et al.</i> , 2010
OXA-23	2007-2008	PARANÁ	FJ628170 (Genbank)
OXA-23	2008-2009	MINAS GERAIS	LINCOPAN <i>et al.</i> , 2010

Nota: Adaptado de WALTHER-RASMUSSEN & HOIBY, 2006.

Figura 4. Ilustração da distribuição e do contexto genético das enzimas do tipo OXA em *Acinetobacter baumannii*. As porcentagens correspondem ao grau de homologia dos aminoácidos entre os clusters das enzimas. As enzimas localizadas nos círculos correspondem às enzimas adquiridas e a no quadrado corresponde à enzima natural do microrganismo. Fonte: PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008.

1.6.1.2.2 Metallo-beta-lactamases

As MβLs têm sido descritas em *Acinetobacter spp.* desde o início da década de 90 (POIREL *et al.*, 2000). Estas enzimas são metaloenzimas que hidrolisam todos os β-lactâmicos, exceto o monobactâmico aztreonam (NORDMANN; POIREL, 2002) e requerem zinco (Zn⁺⁺) como co-fator para a atividade catalítica por terem a mesma estrutura tridimensional e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com cátions bivalentes (MURPHY *et al.*, 2003). Por isso são inibidas por compostos quelantes de cátions divalente como o ácido etilenodiamino tetra-acético, EDTA (OLIVER, 2004) ou compostos derivados do ácido tióicos,

como o ácido 2-mercaptopropiônico, os quais têm a propriedade de quelar o zinco (QUEENAN; BUSH, 2007).

As MβLs resistem à ação da maioria dos inibidores de β-lactamases, como o clavulanato, sulbactam e tazobactam (LIVERMORE, 2002). Estas enzimas pertencem à classe B de AMBLER (1980) ou ao grupo 3 de BUSH-JACOBY-MEDEIROS (1995), com base em uma combinação de características estruturais, afinidade do anel β-lactâmico pelos íons zinco no sítio ativo e características de hidrólise. São subdivididas em 3 subgrupos: o subgrupo 3a, no qual encontram-se as MβL de amplo espectro de ação; o subgrupo 3b, encontrando-se as enzimas que hidrolisam preferencialmente os carbapenens e o subgrupo 3c, no qual encontram-se enzimas que hidrolisam fracamente os carbapenens.

Com exceção da enzima SPM-1, que é codificada por um gene localizado em plasmídeo (TOLEMAN *et al.*, 2002; POIREL *et al.*, 2004), as demais MβLs adquiridas são codificadas por genes localizados em integrons de classe 1 (WALSH *et al.*, 2003; TOLEMAN *et al.*, 2003; PATZER *et al.*, 2004, MENDES *et al.*, 2004), os quais podem intergrar-se ao transposon ou plasmídeo bacteriano, elementos genéticos móveis de fácil transmissibilidade. Por isso, estas enzimas passaram a ser conhecidas como MβLs móveis ou adquiridas (SACHA *et al.*, 2008).

Foram identificados seis grupos de MβL adquiridas: imipenemase (IMP-like), Verona imipenemase (VIM-like), Seoul imipenemase (SIM-1), São Paulo imipenemase (SPM-1), German imipenemase (GIM-1) e, mais recentemente, a Austrália imipenemase (AIM), porém apenas os três primeiros foram descritos em *A. baumannii*. (QUEENAN; BUSH, 2007; GUPTA, 2008; YOUNG *et al.*, 2007), nos quais foram identificados IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-11, VIM-1 e SIM-1, sendo que esta última, possui uma menor capacidade de hidrolisar os carbapenens quando comparada com as demais MβLs (WALSH *et al.*, 2005; QI, 2008).

A primeira subclasse, chamada IMP-1, foi descoberta em 1994 no Japão, em cepa de *Serratia marcescens* que apresentava fenótipo de

resistência ao imipenem e cefalosporinas de espectro ampliado. Esta foi a primeira M β L adquirida detectada e, durante muitos anos, ficou restrita ao país de origem (OSANO *et al.*, 1994). Atualmente, mais de 20 variantes de IMP têm sido relatadas (<http://www.lahey.org/studies/>).

A segunda subclasse de M β L adquirida, a VIM-1, foi isolada de *Pseudomonas aeruginosa*, em 1999 em Verona, na Itália. Possui distribuição concentrada em determinadas áreas geográficas, como na Europa, onde originou-se (LAURETTI *et al.*, 1999). Atualmente, mais de 22 variantes desta enzima foram descritas, isoladas principalmente de *Pseudomonas aeruginosa* (<http://www.lahey.org/studies/>).

A SPM-1, terceira subclasse de M β L adquirida, foi encontrada em amostra de *P. aeruginosa* em 1997, recuperada do trato urinário de paciente hospitalizado no Complexo Hospital São Paulo. Parece estar especificamente relacionada com esta espécie, visto que não foi detectada em outros microrganismos (GALES, 2003b; POIREL *et al.*, 2004).

A quarta subclasse, GIM-1, foi identificada em *P. aeruginosa* em 2002, em Dusseldorf, na Alemanha (CASTANHEIRA *et al.*, 2004). A enzima SIM-1 foi a mais nova subclasse descrita em *Acinetobacter spp.* em 2005, na Coreia (LEE *et al.*, 2005).

No Brasil, o primeiro relato de amostras produtoras de M β L foi em 2002, porém o determinante de resistência não foi caracterizado. Posteriormente, foi relatada por GALES *et al.* (2003a) a ocorrência da variante IMP-1 isolada de um paciente com pneumonia nosocomial internado no Hospital São Paulo. A partir deste relato, a disseminação de patógenos nosocomiais produtores de M β Ls tem sido relatada com frequência em hospitais brasileiros (LINCOPAN *et al.*, 2005; LINCOPAN *et al.*, 2006; SADER *et al.*, 2005b; TOGNIM *et al.*, 2006).

A identificação da produção de M β L é realizada pelo uso da fita Etest M β L (AB Biodisk, Suécia), que se caracteriza por conter imipenem em uma extremidade e, na outra, imipenem associado com EDTA, pois a presença do inibidor em uma das extremidades da fita promove uma redução da concentração inibitória mínima (CIM) de três ou mais diluições, sendo este

parâmetro um indicativo da produção de M β L pela bactéria (WALSH *et al.*, 2005). Este teste tem mostrado alta sensibilidade (94%) e especificidade (95%) quando utilizado em produtores de M β L, porém falso-positivos têm sido reportados em casos em que a CIM de imipenem é inferior a 4 μ g/ml ou quando o EDTA tem efeito inibitório sobre determinada bactéria, devido ao efeito de permeabilidade da membrana externa e, também, em casos em que o *A. baumannii* é produtor de OXA-23 (SEGAL; ELISHA, 2005; QUEENAN; BUSH, 2007).

Os testes de aproximação de discos com EDTA ou com ácido 2-mercaptopropiônico são frequentemente usados em triagem para detectar produtores de M β Ls. Nestes testes, a zona de inibição ao redor do disco com o beta-lactâmico é alterada pela ação do inibidor de M β L. Os antibióticos imipenem, ceftazidima e cefepime têm sido usados nestes testes (QUEENAN; BUSH, 2007). Apresentam boas sensibilidade e especificidade, porém esses resultados podem variar de acordo com a espécie bacteriana testada, o substrato e o agente quelante utilizado.

Em estudo realizado por LEE *et al.* (2003), o ácido mercaptoacético apresentou melhor sensibilidade (100%) na detecção de amostras de *Acinetobacter spp.* produtoras de M β Ls, porém esse mesmo quelante falhou em detectar 10,5% das amostras de *Pseudomonas spp.* testadas. Em contrapartida, o EDTA apresentou melhor detecção da produção de M β Ls em amostras de *P. aeruginosa* (100%), mas falhou em detectar 6% das amostras de *Acinetobacter spp.*

1.6.1.2.3 Outras beta-lactamases

Outras enzimas foram descritas em *A. baumannii*, dentre elas estão a cefalosporinase cromossomal do tipo AmpC, representando uma família distinta de β -lactamases, as ADCs, cefalosporinases derivadas de *Acinetobacter* que hidrolisam penicilinas e cefalosporinas de estreito e amplo espectro. Não hidrolisam a cefepime e os carbapenens (HUJER *et al.*, 2005). A

cefalosporinase do tipo AmpC (BOU; MARTINEZ-BELTRAN, 2000) é um tipo intrínseco de beta-lactamase identificada em isolados de *A. baumannii* e expressam resistência a antibióticos quando a sequência de inserção ISAba-1 é introduzida na região *upstream* do gene (SEGAL; NELSON; ELISHA, 2004).

As β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) já identificadas em *Acinetobacter baumannii* foram PER-1, PER-2, VEB-1, SHV-12, TEM-1, TEM-92, TEM-116, CTX-M-2 e SCO-1, conferindo resistência a cefalosporinas de terceira e quarta geração, monobactams e a última adicionalmente aos carbapenems (CELENZA *et al.*, 2006; ENDIMIANI *et al.*, 2007; NAIEMI *et al.*, 2005; NAAS *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2004; HUJER *et al.*, 2006; POIREL *et al.*, 2005a). Mais recentemente, uma ESBL identificada em *Acinetobacter baumannii*, a GES, tem sido responsável por resistência aos antibióticos carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007; MOUBARECK *et al.*, 2009).

1.6.2 Mecanismos não enzimáticos

1.6.2.1 Alterações nas PBPs e OMPs

Recentemente, demonstrou-se que o *A. baumannii* possui proteínas de membrana externa (OMPs) que exercem um papel importante na resistência aos carbapenems.

Estudos clínicos demonstraram que a resistência aos antimicrobianos está relacionada com modificações no perfil das OMPs, provocando mudanças na classe das porinas, no tamanho, redução dos níveis de expressão ou pela presença de porinas que sofreram mutações, causando a restrição da entrada dos antibióticos e diminuindo a concentração interna da droga, resultando em resistência aos antibióticos β -lactâmicos (PAGÈS; JAMES; WINTERHALTER, 2008; QUINN *et al.*, 1989).

LIMANSKY *et al.* (2002) demonstraram que a resistência ao imipenem esteve associada com a perda de uma proteína de membrana externa de 29 kDa,

chamada CarO, nos isolados clínicos de *A. baumannii* e que nenhuma atividade de enzimas carbapenemases foi detectada nestes isolados. Estas proteínas parecem possuir um canal monomérico inespecífico para o imipenem, diferentemente da OprD da *P. aeruginosa* (NIKAIDO, 2003; SIROY *et al.*, 2005).

Recentemente, uma proteína de 43 kDa, denominada D2, foi identificada em *A. baumannii* como homóloga da OprD, uma porina associada frequentemente com a resistência ao imipenem em *P. aeruginosa* (DUPONT *et al.*, 2005).

Estudos de *A. baumannii* multirresistentes em Nova York demonstraram a presença de isolados resistentes aos carbapenens com uma redução da expressão das OMPs de 37, 44 e 47 kDa e um aumento na expressão das cefalosporinases de classe C (QUALE *et al.*, 2003), embora tenha-se estudado apenas um número relativamente pequeno e não tenha sido investigada a presença de M β L e OXA.

Em alguns isolados estudados em Madri, a perda de OMPs de 22 kDa e 33 kDa combinada com a produção de OXA-24-like resultou em resistência aos carbapenens (BOU; OLIVER; MARTINEZ-BELTRAN, 2000).

Estudos feitos por DEL MAR TOMAS *et al.* (2005) com isolados de *Acinetobacter baumannii* que não produziram carbapenemases verificaram que a resistência elevada aos carbapenens era devido à perda de OMPs de 33 a 36 kDa.

O número e o tamanho reduzidos de porinas poderiam explicar a diminuição na permeabilidade de membrana externa do *A. baumannii*, sendo esta menor que 5% quando comparada com a de outros microrganismos e menos permeável a antimicrobianos que nos demais, podendo ser atribuída a este fato, a sua resistência intrínseca (OBARA; NAKAE, 1991).

A redução na expressão das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) também está associada à resistência do *A. baumannii* aos carbapenêmicos, como foi descrito por FERNANDEZ-CUENCA *et al.* (2003), que identificaram uma redução na expressão da PBP-2 em isolados de *A. baumannii* em Sevilla, na Espanha.

1.6.2.2 Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são expressas em todas as células vivas, protegendo-as de efeitos tóxicos dos produtos químicos orgânicos. A resistência bacteriana a diferentes classes de antibióticos foi associada à superexpressão dessas bombas, funcionando sinergicamente com a baixa permeabilidade da membrana externa (POOLE, 2002). Um aumento de efluxo do antibiótico acarreta em um acúmulo da droga e alteração da CIM (BARKER, 1999).

O sistema de efluxo foi agrupado em seis famílias: 1- *adenosine triphosphate binding cassette family* (ABC); 2- *major facilitator superfamily* (MFS); 3- *resistance-nodulation-division family* (RND); 4- *multidrug and toxic compound extrusion family* (MATE); 5- *Small Multidrug resistance family* (SMR); 6- *drug/metabolite transporter superfamily* (DMT). (POOLE, 2005).

No *A. baumannii*, a resistência aos antimicrobianos esteve associada geralmente com as famílias MFS e RND. A família MFS é representada por Tet(A), Tet(B) e ClmA. O determinante Tet(A) confere resistência à tetraciclina, o Tet(B) confere resistência à tetraciclina e minociclina (MARTÍ *et al.*, 2006) e o ClmA confere resistência ao cloranfenicol e foi recentemente descrito por FOURNIER *et al.* (2006). A família RND possui um complexo chamado AdeABC, primeiro sistema descrito em *Acinetobacter spp.* e que confere resistência aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, eritromicina, cefotaxima, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim e tigeciclina (MAGNET *et al.*, 2001; PELEG *et al.*, 2007). Podem causar alta resistência quando associada com a presença de oxacilinases (MARQUE *et al.*, 2005). Esta família possui ainda, o sistema AdeDE, também descrito em *A. baumannii* e que confere resistência aos antibióticos citados anteriormente e também, à amicacina, ceftazidima, rifampicina e meropenem (CHAU *et al.*, 2004) e o sistema AdeIJK, que contribui para a resistência intrínseca do *Acinetobacter baumannii* aos beta-lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, novabiocina e rifampicina (DAMIER-PIOLLE *et al.*, 2008).

Recentemente, um outro sistema de efluxo, o AbeM, pertencente à família MATE, foi identificado em *A. baumannii* e parece conferir resistência às fluoquinolonas, gentamicina, cloranfenicol, eritromicina e trimetoprim (SU *et al.*, 2005).

1. 7 Contexto genético

O gênero *Acinetobacter spp.* tem uma grande capacidade de adquirir novos determinantes de resistência (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996).

1.7.1 Sequências de inserção (IS)

As sequências de inserção (IS) são pequenos fragmentos de DNA (<2.5 kb) capazes de realizar transposições independentes em genomas microbianos (NEVERS; SADLER, 1977). Causam mutações de inserção, rearranjos no genoma e favorecem a disseminação de determinantes de resistência e de virulência nas espécies (AUBERT *et al.*, 2006; POIREL; DECOUSSER; NORDMANN, 2003).

As sequências de inserção codificam apenas proteínas relacionadas com a atividade de transposição, como as transposases, responsáveis por catalisar reações enzimáticas e uma proteína reguladora capaz de estimular ou inibir a atividade de transposição. Já os transposons, adicionalmente carregam genes de resistência a antibióticos e/ou genes de virulência (MAHILLON; CHANDLER, 1998).

Baseada em análises prévias *in silico*, a IS*Aba*-1 é formada por curtas sequências de repetições invertidas de 15 pb, limitada por curtas sequências de repetições diretas de 9 pb e por uma tríade de aminoácidos DDE (Asp/Asp/Glu) (CHANDLER; MAHILLON, 2002; HÉRITIER; POIREL; NORDMANN, 2006, KULKOSKY *et al.*, 1992).

O número de cópias e a mobilidade da IS*Aba*-1, combinados com um repertório de sequências reguladoras, sugerem que este elemento exerce um papel significativo no controle da expressão de uma variedade de genes no *Acinetobacter spp.* Até o momento, esta sequência de inserção não foi relatada em nenhum outro gênero diferente de *Acinetobacter* provavelmente devido esta sequência encontrar-se em plasmídeos específicos de *Acinetobacter*, sendo assim seria incompatível a transferência deste gene para outro gênero (SEGAL *et al.*, 2005).

A superexpressão de genes de resistência em *A. baumannii* tem sido associada com a presença da sequência de inserção IS*Aba*-1 em regiões adjacentes aos genes *bla*_{AmpC} e *bla*_{OXA-51}, os quais são naturais do cromossomo e, ao gene *bla*_{OXA-23}, que codifica uma oxacilinase, podendo ter ação similar em outros genes de resistência. Podem ser responsáveis pela mobilização de *bla*_{OXA-23}, juntamente com duas cópias que suportam estes genes e formam um transposon bacteriano composto, definido por Tn2006 (CORVEC *et al.*, 2007) (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática do transposon bacteriano composto, formado por duas sequências de inserção, que codificam os genes para a transposição, flanqueando os genes estruturais que codificam várias proteínas ou enzimas de resistência a antibióticos, por exemplo. Fonte: Adaptado de CORVEC *et al.*, 2007.

1.7.2 Integrons de classe 1

A captura e mobilização dos genes de resistência têm sido associadas com determinantes de resistência, os quais podem estar inseridos em plasmídeos, transposons ou em cromossomos bacterianos (POIREL *et al.*, 2005b).

Os integrons de classe 1 são elementos genéticos incapazes de se moverem, necessitando ser carregados por plasmídeos ou transposons. Os integrons contêm genes *Int* e cassetes que podem ser mobilizados para outros integrons ou para locais secundários no genoma bacteriano (POIREL *et al.*, 2001; SEVERINO; MAGALHÃES, 2004, TURTON *et al.*, 2005). São sistemas de recombinação sítio-específica responsáveis pelo reconhecimento, captura e pela expressão de cassetes gênicos. O integron contém três elementos importantes para a captura e expressão de genes exógenos (RECCHIA *et al.*, 1997): um gene codificador de integrase (*intI*), uma sequência *attI* que vem em continuação do *intI* e um ou dois promotores responsáveis pela expressão do cassete gênico inserido (SABATÉ *et al.*, 2002).

A região conservada 5' (5-CS) é formada pelo gene *intI1*, uma região promotora, e pelo sítio de recombinação (*attI1*). A região conservada 3' (3-CS) é geralmente composta do gene *qacEΔ1* conjugado ao gene *sul1*, sendo que esses genes codificam resistência a compostos de amônio quaternário e sulfonamidas, respectivamente (BENNETT, 1999).

Na região *upstream* ao gene *intI1*, integrons apresentam uma região promotora, a qual é responsável pela expressão dos cassetes gênicos inseridos entre as regiões conservadas 5' e 3' (PARTRIDGE; BROWN; HALL, 2002). Essa região é formada por um promotor denominado P_{ant}. Variações dessas sequências já foram encontradas e podem ocasionar diferenças nas taxas de transcrição dos cassetes gênicos (STOKES; HALL, 1989). Alguns integrons de classe 1 podem também apresentar um segundo promotor, localizado na região *downstream* de P_{ant} (COLLIS; HALL, 1995).

Análises realizadas nos genes que codificam as MβLs em *A. baumannii* identificaram estruturas muito semelhantes entre os genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e

bla_{SIM}, inseridas em integrons de classe 1. Estes genes formam parte dos cassetes gênicos que estão inseridos entre os segmentos conservados 5' e 3' junto com outros genes cassetes de resistência a antibióticos que codificam, em sua maioria, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. A posição de genes plasmidiais de MβLs explicam a sua propagação em isolados de *A. baumannii* em áreas específicas, como na Itália e na Coreia (POIREL; NORDMANN, 2006). A constituição de um integron de classe 1 pode ser observada na **figura 6**.

Figura 6. Representação esquemática de integron de classe 1. IR representa os terminais de repetição invertidos. As regiões conservadas 5' consiste em *int11* e sítio de inserção *attI1* e 3' consiste nos genes *qacEΔ1*, *sul1* e *orf5* de função desconhecida, seguidas do módulo de transposição *tni*, consiste nos genes *tniBΔ1* e *tniA*. As setas com os genes indica a direção da transcrição. Fonte: MENDES *et al.*, 2004.

1.8 Tipagem genotípica

A análise da variabilidade genética torna-se necessária na realização de estudos epidemiológicos que avaliam o grau de similaridade entre cepas envolvidas em infecções hospitalares, possibilitando caracterizar surtos, avaliar possíveis fontes e mecanismos de transmissão, assim como modos de aquisição do microrganismo (OLIVE; BEAN, 1999; HARRIS *et al.*, 1999).

Uma das técnicas moleculares bastante utilizada para avaliar a diversidade clonal entre microrganismos é o ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence*), que consiste na amplificação dos segmentos conservados presentes no DNA de Enterobactérias (AYDIN *et al.*, 2007). As regiões conservadas são amplificadas por meio da técnica de reação

de polimerização em cadeia (PCR). Esta metodologia apresenta boa capacidade discriminatória, reprodutibilidade, fácil interpretação, rapidez e baixo custo (SYRMIS *et al.*, 2004, PUJANA *et al.*, 1999, RENDERS *et al.*, 1996).

Estudos têm mostrado que o ERIC-PCR tem um poder discriminatório semelhante ao do PFGE para a realização de tipagem genotípica em *Acinetobacter baumannii*, apresentando 100% de tipabilidade e boa reprodutibilidade (SILBERT *et al.*, 2004).

Com base no estudo das unidades taxonômicas, DOS ANJOS BORGES *et al.* (2003) originaram um protocolo que utiliza a porcentagem de similaridade de 90% no dendrograma, apresentando diferença de apenas 1 banda entre as cepas. Este protocolo utilizou esta porcentagem com a finalidade de reduzir o número de unidades taxonômicas e facilitar a interpretação do dendrograma.

2. OBJETIVOS

Geral

Identificar e caracterizar genes codificadores de carbapenemases de classe B (metalo-beta-lactamases) e D (oxacilinases), sequências de inserção (IS*Aba*-1 e IS*Aba*-3) e determinar a diversidade genética dos isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* de hospitais das regiões Sudeste e Sul do Brasil.

Específicos

- ⇒ Determinar o perfil de resistência aos antibióticos de uso convencional em amostras clínicas de *Acinetobacter baumannii* resistentes ao imipenem;
- ⇒ Avaliar a produção de carbapenemases nos isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes ao imipenem, por meio da hidrólise enzimática com e sem adição de inibidores enzimáticos;
- ⇒ Comprovar a presença intrínseca do gene *bla*_{OXA-51} para a identificação da espécie;
- ⇒ Identificar os principais genes codificadores das carbapenemases em *Acinetobacter baumannii* relacionados com resistência ao imipenem;
- ⇒ Identificar sequências de inserção associadas a genes *bla*_{OXA};
- ⇒ Determinar a diversidade genética dos isolados resistentes aos carbapenens, por meio da técnica de ERIC-PCR.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas

Foram utilizados 36 de um total de 100 isolados de *Acinetobacter baumannii* selecionados a partir de diversos espécimes clínicos, coletados no período de 2004 a 2008, previamente identificados como resistentes ao imipenem, provenientes de 8 centros hospitalares brasileiros, sendo 7 do município de São Paulo e um hospital do município de Ponta Grossa, no Paraná (**Tabela 4**).

Tabela 4. Dados de procedência e isolamento das amostras

Amostras	Espécime clínico	Centros hospitalares	Data de isolamento
01	secreção traqueal	HU	18/08/04
46	escarro	SCM	18/08/07
3950	secreção de queimadura	HGVP	20/09/07
4347	secreção de queimadura	HGVP	08/11/07
54	dreno/escarro	SCM	31/12/07
52	dreno	SCM	20/01/08
56	escarro	SCM	25/01/08
55	líquido peritoneal	SCM	26/01/08
53	secreção cirúrgica	SCM	13/02/08
1110	urina	BP	03/04/08
649	secreção de ferida operatória	BP	12/04/08
659	secreção de escara sacral	BP	15/04/08
1013	urina	BP	21/05/08
919	lavado broncoalveolar	BP	26/05/08
580	secreção de parede abdominal	BP	19/06/08
906	líquido de vesícula biliar	BP	19/06/08
1089	hemocultura	BP	19/06/08
824	ponta de catéter	BP	02/07/08
770	urina	BP	18/07/08
39	hemocultura	HRR	21/07/08
30	secreção de escara	HRR	31/07/08
81	secreção de ferida	HAM	13/08/08
34	ponta de cateter	HA	16/08/08
493	ponta de catéter	BP	17/08/08
80	secreção external	HAM	18/08/08
26	secreção cervical	HA	19/08/08
605	secreção do mediastino	BP	21/08/08
736	secreção de ferida operatória	BP	21/08/08
803	secreção traqueal	BP	21/08/08
804	ponta de catéter	BP	02/09/08
1031	urina	BP	04/09/08
1020	urina	BP	07/09/08
559	ponta de catéter	BP	15/09/08
28	secreção traqueal	HAM	12/10/08
45	lavado broncoalveolar	HJ	29/10/08
33	ponta de cateter	HAM	04/11/08

Nota: HGVP: Hospital Geral Vila Penteado, HU: Hospital Universitário, BP: Beneficência Portuguesa, HAM : Hospital Alvorada Moema, HJ: Hospital Jaraguá, HRR: Hospital Rudge Ramos, HÁ: Hospital Avicena, SCM: Santa Casa de Misericórdia de Ponta Grossa (PR).

3.2 Condições de cultura

As amostras foram semeadas em 3ml de caldo Mueller-Hinton e incubadas por 24 horas a 37 °C, sob agitação constante em *shaker* rotativo a 150 rpm. Posteriormente, foram cultivadas em ágar Mac Conkey com disco de imipenem de 10 µg e incubadas em estufa controlada a 37 °C por 24 horas. O produto desta cultura foi armazenado em 20% de glicerol e preservado a -20 °C. Foi utilizado também para a extração de DNA.

3.3 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

O perfil de sensibilidade antibacteriana foi avaliado pelo método de Kirby-Bauer empregando-se discos comerciais impregnados com antibióticos (CECON, São Paulo, Brasil; OXOID, Cambridge, UK), segundo as normas padronizadas pelo CLSI/NCCLS (CLSI, 2006), utilizando-se a cepa *A. baumannii* ATCC 19606 para o controle de qualidade. Os antibióticos testados foram os utilizados nos esquemas terapêuticos convencionais para os casos de infecções por *A. baumannii*. As placas foram mantidas em estufa controlada a 37 °C e após 16 a 18 horas, foi feita a leitura das zonas de inibição, com diâmetros medidos em milímetros, usando luz direta e não refletida.

3.4 Concentração inibitória mínima do imipenem

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do imipenem foi realizada empregando-se o método de diluição em ágar de acordo com as normas da CLSI/NCCLS, 2006.

Foram realizadas diluições seriadas a partir de 19 mL de ágar Mueller-Hinton (Merck, Darmstad-Alemanha), estocados em tubos, onde se encontrava previamente esterilizado e estabilizado em uma temperatura entre 45° a 50 °C.

Foi adicionado neste meio, 1 mL da solução de imipenem (Tiepen IV – Biochimico), com concentração 20 vezes superior para cada diluição testada, obtendo concentrações decrescentes de 512 µg/mL a 0,03 µg/mL.

Após homogeneização, a mistura do ágar MH e antibiótico IMP foi dispensada em placas de Petri estéreis de 90 x 15 mm. Para o inóculo empregou-se a bactéria na fase exponencial de crescimento. Para tanto foram semeados 10 µL de suspensão bacteriana incubados por uma noite e destes, 2 ml de cada amostra foram semeados em caldo Mueller-Hinton (DIFCO, Lawrence, KS. USA), e incubados a 37 °C durante duas a três horas. Para obter turbidez correspondente a 10^8 bact/mL, ou seja, escala 0,5 de Mcfarland, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de λ 625 nm com absorbância entre 0,8 e 1,0.

A suspensão bacteriana na escala 0,5 de Mcfarland, foi diluída em caldo Mueller-Hinton estéril na proporção de 1:100 resultando num inóculo de aproximadamente 10^6 UFC/ml. Assim, 300µL dessa suspensão foram transferidos para o inoculador. Posteriormente, foram inoculados de 1 a 3 µL de cada amostra na superfície do ágar, atingindo uma concentração bacteriana final de 10^4 UFC/mL (NCCLS) e incubadas entre 18 a 20 horas. A CIM foi considerada a menor concentração do antibiótico em que não mostrou crescimento visível da bactéria e foram lidas de acordo com os critérios de sensibilidade estabelecidos pela CLSI para *A. baumannii* (CLSI 2008). Como controle foi utilizada a cepa padrão de *A. baumannii* ATCC 19606.

Os resultados foram confirmados utilizando-se fitas de Etest, que consistem em fitas plásticas contendo gradientes de concentração de imipenem até 32 µg/ml (IPM).

3.5 Triagem para detecção de carbapenemases (M β L e OXA)

3.5.1 Dupla difusão de disco para detecção de M β L

A triagem para a produção de M β L foi realizada mediante sinergismo com o teste de dupla difusão de disco, segundo as recomendações do CLSI (ARAKAWA *et al.*, 2000, CLSI/NCCLS 2006). As suspensões de cada amostra em caldo Mueller-Hinton, na escala 0,5 de Mcfarland, foram semeadas em ágar Mueller-Hinton. Foram dispostos na placa, discos de papel filtro, impregnados com 5 μ L de cada inibidor enzimático (EDTA 0,5 M, ácido 2-mercaptoacético e ácido 2-mercaptopropiônico) e foram alinhados a 2 cm dos discos com os substratos imipenem (10 μ g - OXOID, Cambridge, UK) e ceftazidima (30 μ g - OXOID, Cambridge, UK). Foram ainda dispostos na placa, discos de antibióticos que foram impregnados com 5 μ L de cada inibidor enzimático com uma distância de 3,5 cm entre os discos (**Figura 7**). As placas foram mantidas em estufa controlada a 37°C e após 16 a 18 horas, foi feita a leitura das zonas de inibição, com diâmetros medidos em milímetros, usando luz direta e não refletida.

Legenda:

IP: imipenem;
CAZ: ceftazidima;
MAA: ácido 2-mercaptoacético;
MAP: ácido 2-mercaptopropiônico;
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-
acético.

Figura 7. Representação esquemática do método da dupla difusão de disco.

3.5.2 Etest M β L

O preparo e a inoculação da suspensão bacteriana foi realizada da mesma maneira que no método anterior. Em seguida a fita foi dispensada na placa. A detecção de M β L foi determinada de acordo com os critérios propostos por WALSH *et al.* (2002). O teste comercial (Etest® M β L - AB BIODISK) para detecção de metalo- β -lactamase, consiste numa fita plástica contendo gradientes de concentração de imipenem de 4 a 256 μ g/ml (IPM) de um lado da tira e gradientes de IPM+EDTA de 1 a 64 μ g/ml (IPI) na outra extremidade. O teste seria considerado positivo se fosse observada uma redução no MIC ≥ 3 log ou IPM/IPI ≥ 8 (WALSH *et al.*, 2002).

3.5.3 Teste de Hodge

O teste de Hodge foi realizado a partir de uma suspensão na escala 0,5 de McFarland das cepas ATCC 25922 de *Escherichia coli* (CLSI, 2009) e ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* (LEE *et al.*, 2001), as quais foram semeadas em placa com ágar Mueller-Hinton. Posteriormente, foi colocado um disco de imipenem (10 μ g - OXOID, Cambridge, UK) no centro da placa que foi semeada a cepa ATCC de *Escherichia coli* e um disco de oxacilina (1 μ g - OXOID, Cambridge, UK) no centro da placa que foi semeada a cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*. As suspensões com os isolados testados, foram incubados por uma noite e estriadas perpendicularmente a partir do disco de antibiótico. Posteriormente, as placas foram mantidas em estufa controlada a 37 °C. Após 18 horas de incubação, foi feita a leitura, verificado se houve distorção das zonas de inibição, usando luz direta e não refletida.

3.6 Extração de DNA

Para extração do DNA total foi utilizado o método de fervura. A partir de uma cultura em caldo Mueller Hinton, alíquotas de 1 mL foram submetidas à centrifugação de 15.000 rpm por 1 minuto. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de água milli-Q estéril. Os microtubos contendo os precipitados ressuspenso foram fervidos durante 10 minutos e mantidos em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, foram centrifugados por 15 minutos a 9.000 rpm. Finalmente, 100 µL de cada sobrenadante foram transferidos para um microtubo estéril e congelado a - 20 °C.

Como controle interno de extração, as amostras obtidas foram submetidas a PCR utilizando-se os *primers*: 11E 5'-GAGGAAGGTGGGGATGACGT-3' e 13B 5'-AGGCCCGGGAACGTATTAC- 3', para pesquisa da subunidade de DNA ribossômico 16S.

A extração do DNA plasmidial, foi realizada utilizando o Kit NucleoSpin® Plasmid (MACHEREY-NAGEL, Alemanha), baseado no método da lise alcalina. A partir de uma cultura em caldo LB por toda a noite, alíquotas de 3 mL foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspenso em 250 µL da solução I (glicose 50Mm, Tris-HCl 25mM, EDTA 10Mm, Rnase) gelada. Após homogeneização, foram adicionados 250 µL da solução II (0.2N NaOH, SDS 1%) e o tubo foi mantido à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foram adicionados 300 µL da solução neutralizante, para deter a lise alcalina. Após centrifugação a 11.000 g por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para a membrana de sílica para uma nova centrifugação. Posteriormente o precipitado foi lavado com etanol e centrifugado por 1 minuto a 11.000 g e novamente por 2 minutos para secar a membrana. Utilizando-se uma solução de eluição, o DNA plasmidial foi removido da membrana e estocado a -20 °C (BIRNBOIM; DOLY, 1979).

3.7 Confirmação genotípica de β -lactamases

A confirmação genética dos determinantes de resistência foi realizada pela técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para amplificar os genes de M β L: *bla*_{IMP}-like, *bla*_{SIM}-like (MENDES *et al.*, 2007), *bla*_{VIM}-like, (LOLI *et al.*, 2006); os genes de OXA: *bla*_{OXA-23}-like, *bla*_{OXA-51}-like, *bla*_{OXA-58}-like, *bla*_{OXA-24}-like (WOODFORD *et al.*, 2006) e os genes de mobilização *ISAb*_a-1, *ISAb*_a-3. As sequências dos oligonucleotídeos e o tamanho dos produtos encontram-se descritos na **Tabela 5**.

Os ensaios de PCR foram realizados no termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, USA) e a amplificação foi realizada nos seguintes parâmetros: desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos, seguida da etapa de amplificação com 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 1 minuto, hibridização à 50 °C por 1 minuto, etapa de extensão à 72 °C por 2 minutos e extensão final à 72 °C por 5 minutos.

Tabela 5. Alvos a serem amplificados para a detecção de genes *bla_{OXA}*, *bla_{MβL}* e IS.

PRIMERS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE MβL			
Alvo	Primer	Sequência oligonucleotídica	Tamanho do amplicon
<i>bla</i> _{VIM-like}	VIM-like f	5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3'	~ 600 bp
	VIM-like r	5'-GAATGCGCAGCACCAGGAT-3'	
<i>bla</i> _{IMP-like}	IMP-1 f	5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC-3'	~ 700 bp
	IMP-1 r	5'-GAACAACCAGTTTTGCCTTACC-3'	
	IMP-2 f	5'-GTTTTATGTGTATGCTTCC-3'	
	IMP-2 r	5'-AGCCTGTTCCCATGTAC-3'	
<i>bla</i> _{SIM-like}	SIM-like f	5'-GTACAAGGGATTTCGGCATCG-3'	~ 569 bp
	SIM-like r	5'-TGGCCTGTTCCCATGTGTGAG-3'	
PRIMERS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE OXA E IS			
<i>bla</i> _{OXA-51}	OXA-51 r	5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'	~ 352 pb
	OXA-51 f	5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3	
<i>bla</i> _{OXA-58}	OXA-58 r	5'-CC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3'	~ 597 pb
	OXA-58 f	5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3'	
<i>bla</i> _{OXA-23}	OXA-23 r	5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3	~ 501 pb
	OXA-23 f	5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3	
<i>bla</i> _{OXA-24}	OXA-24 r	5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3'	~ 248 pb
	OXA-24 f	5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3	
<i>ISAb</i> _a 1 <i>bla</i> _{OXA-51}	ISAb _a 1 r inv	5' GTG TCA TAG TAT TCG TCG 3'	~ 359 pb
	OXA-51 f inv	5' CAA GGC CGA TCA AAG CAT TA 3'	
<i>ISAb</i> _a 1	ISAb _a 1 r	5' CGA CGA ATA CTA TGA CAC 3'	~ 548 pb
	ISAb _a 1 f	5' CAC GAA TGC AGA AGT TG 3'	
<i>ISAb</i> _a 3	ISAb _a 3 r	5' CGT TTA CCC CAA ACA TAA GC 3'	~ 403 pb
	ISAb _a 3 f	5' CAA TCA AAT GTC CAA CCT GC 3'	
<i>ISAb</i> _a 3 <i>bla</i> _{OXA-58}	ISAb _a 3 f	5' AGC AAT ATC TCG TAT ACC GC 3'	~ 356 pb
	OXA-58 f inv	5' CAG CAC AAG CCC CAA TAC TT 3'	
<i>ISAb</i> _a 1 <i>bla</i> _{OXA-23}	OXA-23 r	5' ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT 3'	~ 875 pb
	ISAb _a 1 r inv	5' GTG TCA TAG TAT TCG TCG 3'	
<i>ISAb</i> _a 3 <i>bla</i> _{OXA-58}	OXA-58 r inv	5' GTA TGT AGA GCG CAG AGG G 3'	~ 731 pb
	ISAb _a 3 r	5' CGT TTA CCC CAA ACA TAA GC 3'	
<i>ISAb</i> _a 1 <i>bla</i> _{OXA-51}	ISAb _a 1 r inv	5' GTG TCA TAG TAT TCG TCG 3'	~ 692 pb
	OXA-51 r	5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'	

Fonte: Banco de genes da National Library of Medicine (BLAST).

Após amplificação, os produtos do PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando tampão TBE. Foi utilizado um marcador de peso molecular de DNA de 100 pb (GeneRuler SM# 0321, Fermentas), como padrão. O gel foi corado com brometo de etídio e posteriormente visualizado em transluminador UV.

3.8 Reação de sequenciamento

Posteriormente à eletroforese, o produto do PCR foi excisado do gel de agarose e purificado com o Kit “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (Qiagen, Buckinghamshire, UK), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria a 260 nm (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) em nanodrop (NanoDrop® Technologies INC, Wilmington, DE, EUA) com posterior envio para sequenciamento. O resultado foi comparado com as bases de dados disponíveis no BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2008).

3.9 Transferência dos genes de resistência

As cepas que obtiveram elementos de resistência de origem plasmidial ou cromossômica foram submetidas à transformação. A partir do cultivo das cepas e da linhagem receptora *E. coli* DH10B, foi utilizado o método do CaCl_2 (50 mM), seguido do procedimento descrito por SAMBROOK & RUSSELL (2001).

3.10 Tipagem molecular

3.10.1 ERIC-PCR

A amplificação dos segmentos conservados presentes no DNA bacteriano foi realizada por meio do método de ERIC-PCR. As regiões conservadas do DNA das cepas foram amplificadas pela técnica de PCR a partir do *primer* único ERIC-2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC-3' (AYDIN *et al.*, 2007), específico para estes segmentos. A reação de amplificação apresentou os seguintes parâmetros: desnaturação inicial à 94 °C por 10 minutos; seguida da etapa de amplificação com 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 1 minuto, hibridização à 52 °C por 1 minuto, etapa de extensão à 72 °C por 8 minutos e extensão final à 72 °C por 16 minutos. A visualização dos segmentos foi obtida por eletroforese, em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio e posteriormente visualizado em transuminador UV. A clonalidade foi avaliada a partir do perfil de amplificação, utilizando o coeficiente DICE, em uma tolerância de 2%. As porcentagens de similaridade assim como os cálculos de cluster e a subsequente geração de dendrograma foram realizadas no software Bionumerics (Applied Maths NV©, Sint-Martens-Latem, Belgium). O critério interpretativo para o dendrograma foi baseado nos estudos de DOS ANJOS BORGES *et al.* (2003).

3.11 Hidrólise enzimática e inibição pelo NaCl

As amostras foram repicadas em meio ágar sangue de carneiro a 5%, e incubadas por 18-24 horas a 37 °C. As colônias foram inoculadas em 5mL de caldo TSB (Quelab Laboratories Inc.) e incubadas sob agitação por 18 horas a 37 °C. Os tubos contendo as amostras foram submetidos à centrifugação de 3.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o centrifugado foi ressuspenso com 1mL do tampão da amostra.

Foi utilizado o tampão fosfato de sódio a 25 mM (pH 7.0) para os isolados que apresentaram genes codificadores de oxacilinases. As amostras foram

submetidas à sonicação de 4 ciclos por 30 segundos e ainda ao método de congelamento/descongelamento, baseado em choque térmico, com 3 ciclos em banho de etanol e gelo seco, seguidos de banho maria a 37 °C, segundo protocolo. (BUSH; SINGER, 1989).

O produto sonicado foi transferido para um microtubo e submetido a uma centrifugação de 13.000 rpm 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 espectrofotômetro (Beckman DU640) a 299 nm com a presença de uma solução de 100 µM de imipenem (Merck Sharp Dome, EUA) em uma quantidade de 1.800 µL de solução de imipenem com 200 µL de extrato proteico. Foi utilizado como controle positivo uma cepa de *Acinetobacter baumannii* produtor da enzima OXA-23 e como controle negativo a cepa *E. coli* ATCC 25922. As amostras que apresentaram teste positivo para a hidrólise do imipenem foram utilizadas na verificação da inibição da atividade enzimática pelo NaCl a 1M (Merck). Para isso, 235 µL do extrato proteico foram incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos com 15 µL de NaCl. Como controle positivo para cada reação de inibição, 235 µL do extrato proteico de cada amostra foi incubado com 15 µL de tampão da amostra à 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 (MONTEIRO, 2009).

3.12 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de BRADFORD (1976), com o auxílio do reagente de BRADFORD (BIO RAD®) a uma diluição de 1:10, por espectrofotometria a 590nm (GeneQuant Pro, GE) para averiguação da extração. Foi utilizada a albumina bovina (Sigma®) na concentração de 1mg/mL, como padrão.

4. RESULTADOS

4.1 Antibiógrama e determinação da concentração inibitória mínima do imipenem

Inicialmente, o estudo do perfil de sensibilidade aos antibióticos mostrou que todas as cepas tinham um perfil de multirresistência, apresentando 100% de resistência aos antibióticos imipenem, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina e meropenem. Por outro lado, os antimicrobianos que apresentaram maior atividade *in vitro* contra os isolados de *A. baumannii* foram ampicilina/sulbactam e tobramicina, para os quais os isolados apresentaram 61,2% e 61,1% de sensibilidade, respectivamente.

As porcentagens de isolados resistentes aos demais antibióticos, na ordem decrescente, foram: aztreonam (89%) > sulfametoxazol/trimetoprim (83,4%) > cefepime (69,4%) > amicacina (66,5%) > gentamicina (30,5%). O perfil completo de sensibilidade é apresentado na **tabela 6**.

Na **figura 8 A-C**, são mostrados 3 isolados de *Acinetobacter baumannii* com um perfil típico de multirresistência, onde ampicilina/sulbactam e tobramicina apresentaram atividade *in vitro*.

A concentração inibitória mínima (CIM) do imipenem foi determinada para todas as cepas pelo método de diluição em ágar e alguns resultados foram confirmados utilizando fitas de Etest (**Figura 8 D**). Todas as cepas apresentaram uma CIM elevada para imipenem, com valores iguais e superiores a 16 µg/mL (**Tabela 6**) com uma $CIM_{50/90} \geq 32$ e ≥ 64 µg/ml, respectivamente.

Tabela 6. Sensibilidade antimicrobiana dos 36 isolados de *A. baumannii*

Isolados	Antibiograma (diâmetro halo, mm)											
	Beta-lactâmicos							Aminoglicosídeos			Sulfa trimetoprim	Quinolona
	SAM	PPT	AZT	CAZ	CEP	IMI	MER	AK	CN	TOB	SXT	CIP
01	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
26	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
28	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
30	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
33	S	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R
34	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
39	I	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R
45	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
46	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
52	S	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R
53	S	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R
54	S	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R
55	I	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R
56	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R
80	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
81	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
493	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
559	I	R	S	R	I	R	R	S	S	S	R	R
580	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
605	S	R	I	R	S	R	R	S	S	S	R	R
649	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
659	S	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R	R
736	S	R	I	R	S	R	R	S	S	S	I	R
770	S	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R	R
803	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
804	S	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R	R
824	S	R	I	R	I	R	R	S	S	S	R	R
906	I	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R
919	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R
1013	S	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R	R
1020	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R
1031	I	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R
1089	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1110	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R
3950	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
4347	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
R%	8,3	100	89	100	69,4	100	100	66,5	30,5	38,9	83,4	100
I%	30,5	0	8,3	0	16,6	0	0	5,5	22,2	0	8,3	0
S%	61,2	0	2,7	0	14	0	0	28	47,3	61,1	8,3	0

NOTA: CN, gentamicina; IMP, imipenem; MER, meropenem; CIP, ciprofloxacina; AK, amikacina; CAZ, ceftazidima; TOB, tobramicina; AZT, aztreonam; CEP, cefepime; SXT, sulfa-trimetoprim; SAM, ampicilina + sulbactam; PIP/TAZ, piperacilina + tazobactam. R, resistente; S, sensível; I, intermediário; %, porcentagem. Valores de referência: CN R ≤ 12 S ≥ 15, TOB R ≤ 12 S ≥ 15; CEP R ≤ 14 S ≥ 18, CAZ R ≤ 14 S ≥ 18; PPT R ≤ 17 S ≥ 18; AK R ≤ 14 S ≥ 17; AZT R ≤ 15 S ≥ 22; SAM R ≤ 11 S ≥ 15; SXT R ≤ 10 S ≥ 16; IMI R ≤ 13 S ≥ 16; MER R ≤ 15 S ≥ 20; CIP R ≤ 15 S ≥ 21.

4.2 Triagem para detecção de carbapenemases (MβL E OXA)

4.2.1 Teste de dupla difusão com disco (TDDD)

A triagem para a produção de MβL foi realizada mediante avaliação de sinergismo dos antibióticos imipenem e ceftazidima com os inibidores

enzimáticos EDTA, MAA e MAP, utilizando o teste de dupla difusão com disco, segundo as recomendações do CLSI (ARAKAWA *et al.*, 2000, CLSI, 2006). Todos os resultados foram negativos para este teste sugerindo a ausência de M β L nos isolados estudados.

4.2.2 Método de Etest M β L

Paralelamente, a produção de M β L foi avaliada usando fitas de Etest® M β L em todos os isolados. Os resultados não foram sugestivos de produção de M β L para nenhum dos isolados, porém foi observado resultado falso-positivo em uma cepa produtora de OXA-23. (**Figura 8E**).

Legenda: 1-polimixina; 2-amicacina; 3-tobramicina; 4-ertapenem; 5-imipenem; 6-cefepime; 7-ampicilina/ sulbactam; 8-ceftazidima; 9-piperacilina / tazobactam; 10-cefoxitina; 11-sulfametoxazol/ trimetoprim; 12-meropenem; 13-ciprofloxacina; 14-aztreonam; 15-gentamicina.

Figura 8. Perfil de multirresistência em isolados produtores de OXA-58 (**A**), OXA-23 e (**B**) e OXA-72 (**C**). Ilustração da concentração inibitória mínima de imipenem (CIM >32), determinada por meio da fita **Etest®** em cepa produtora de OXA-23 (**D**). Resultado de **Etest®** M β L falso-positivo em cepa produtora de OXA-23 (**E**).

4.2.3 Teste de Hodge

Os resultados deste teste (Figura 9) mostraram que o método 2 foi o mais adequado para ser utilizado com isolados de *Acinetobacter baumannii* produtores de oxacilinases, para os quais foram observados resultados positivos.

Figura 9. Teste de Hodge.

4.3 Detecção genotípica da produção de M β L, oxacilinases e sequências de inserção (IS)

A detecção dos genes responsáveis pela produção de oxacilinases, metalo-beta-lactamases e IS foi realizada pelo método de PCR (**Figuras 11 e 12**). Inicialmente, os produtos da amplificação sugeriram a presença de genes pertencentes aos grupos *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-24-like} e das sequências de inserção IS*Aba*-1 e IS*Aba*-3. As reações de sequenciamento

realizadas com os produtos da amplificação dos genes proporcionaram a identificação de suas respectivas variantes e das sequências de inserção, quando situadas nas suas regiões adjacentes. Todos os isolados apresentaram positividade para o gene *bla*_{OXA-51} e para a sequência de inserção IS*Aba*-1, porém não estiveram associados quando este elemento foi procurado na região *upstream* do gene. A positividade para o gene *bla*_{OXA-23}, foi detectada em 15 isolados (41,6% dos isolados), os quais estiveram associados com a presença da sequência de inserção IS*Aba*-1 na região *upstream* do gene. Em apenas 1 isolado, foi detectada a presença do gene *bla*_{OXA-58}, associada com a sequência de inserção IS*Aba*-3, localizada nas regiões *upstream* e *downstream* do gene. Não foi detectada a presença de IS*Aba*-3, nos demais isolados. A positividade para o gene *bla*_{OXA-24-like}, foi detectada em 2 isolados, porém não esteve associada com nenhuma das sequências de inserção pesquisadas (IS*Aba*-1 e IS*Aba*-3) (**Tabela 7**).

Nenhum isolado apresentou produto de amplificação para as subclasses de metalo-beta-lactamases pesquisadas.

As sequências de inserção nas regiões adjacentes aos genes, foram identificadas de acordo com o contexto genético ilustrado na **figura 12**.

O sequenciamento dos produtos de amplificação possibilitaram a confirmação da presença da IS*Aba*-1 na região *upstream* do gene *bla*_{OXA-23} (**Figura 13**), da IS*Aba*-3 nas regiões *upstream* e *downstream* do gene *bla*_{OXA-58} (**Figura 14**) e a identificação de um gene pertencente ao grupo *bla*_{OXA-24-like}, o gene *bla*_{OXA-72} (**Figura 15**).

4.4 Transferência dos genes de resistência

As tentativas de transferência dos genes realizadas por transformação não tiveram êxito, provavelmente por incompatibilidade das células receptoras com os ensaios de transferência realizados.

Tabela 7: Genes *bla_{OXA}*, *bla_{NRI}*, e IS identificados em isolados de *A. baumannii*

CEPAS	ANO	Genes <i>bla_{OXA}</i> , <i>bla_{NRI}</i> , e IS														CIM IMI (µg/mL)
		<i>bla_{OXA-23}</i>	IS <i>Aba1</i> / <i>bla_{OXA-23}</i>	<i>bla_{OXA-51}</i>	IS <i>Aba1</i> / <i>bla_{OXA-51}</i>	<i>bla_{OXA-72}</i>	IS <i>Aba1</i> / <i>bla_{OXA-72}</i>	<i>bla_{OXA-72}</i>	IS <i>Aba3</i> / <i>bla_{OXA-72}</i>	<i>bla_{OXA-58}</i>	IS <i>Aba3</i> / <i>bla_{OXA-58}</i>	<i>bla_{IMI}</i>	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{SIM}</i>		
1	2004	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	>64	
3950	2007	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	32	
4347	2007	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	64	
54	2007	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	32	
46	2007	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>32	
34	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>32	
26	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>32	
28	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
30	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>32	
33	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>32	
39	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>32	
45	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>32	
52	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>32	
53	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	32	
55	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	16	
56	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	16	
80	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>32	
81	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>32	
493	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	32	
559	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
580	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
605	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
649	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
659	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
736	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
770	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
803	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	64	
804	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
824	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
906	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
919	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	32	
1013	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
1020	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>32	
1031	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
1089	2008	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	
1110	2008	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	32

Figura 10. Reação de polimerase em cadeia para detecção dos genes codificadores das enzimas OXA e das sequências de inserção.

Figura 11. Reação de polimerase em cadeia para detecção dos genes codificadores das enzimas OXA.

Figura 12. Representação esquemática da localização da IS em regiões adjacentes aos genes *bla*_{OXA}

gcagaagttgatgtcttgttcaattaacatgtaaaccactgctcacgataaaactctctgtc
tgcgaacacattcacaatacggctctttaccaaaaatggctataaagcgttgaatcaaagcaat
acgctctttcgtatctgaatttccacggtttattaagcaatgtccaaaggataggtatcgctat
tccacgataaacgattgcgagcatcaggatattaatatttcgttttcccatattccaattggt
tctatctaaagtcagttgcacttggtcgaatgaaaacatattgaaaatcaactgagaaatttg
acgataatcaaaatactgacctgcaaagaagcgctgcatacgtcgataaaatgattgtggtaa
acacttgatgggcaaggcttttagatgcagaagaaagattacatgtttgctttaaaataatcac
aagcatgatgagcgcaaagcactttaaatgtgacttgttccatttttagagattttgtttaagat
aagatataactcattgagatgtgtcatagtattcgctcgtagaaaacaattattgtgacatta
tttcaatgagttatctatttttgtcgtgtacagagttattttctattgatctggtgtttaaa
tgaataaatattttacttgctatgttggttgcttctctttttctttctggttgtagggttcagc
ataatttaataaatgaaaccccgagtcagattgttcaaggacataatcaggtgattcatcaat
actttgatgaaaaaacacctcaggtgtgctggttattcaaacagataaaaaaattaatctat
atggtaatgctctaagccgcgcaaatacagaatatgtgccagcctctacatttaaaatgttga
atgccctgatcggattggagaaccagaaaacggatattaatgaaatatttaaatggaagggcg
agaaaaggatcatttaccgcttgggaaaaagacatgacactaggagaagccatgaagctttctg
cagtcgccagtctatcaggaacttgccgcgacgtatcggctcttgatctcatgcaaaaagaagtaa
aacgtattggtttcggtaatgctgaaattggacagcaggttgataattttctggttggttaggac
cattaaaggttacgcctattcaagaggtagagtttgtttcccaattagcacatacacagcttc
catttagtgaaaaagtgacggcctaattgtaaaaaatatgcttcttttagaagagagtaattggt
acaaaatttttgaaagactggttgggcaatggataataaaaccacaagtgggctggttgaccg
gctgggt

Figura 13. GenBank Accession no. FJ628170, ISAbA-1 (sublinhado) na região anterior do gene *bla*_{OXA-23} (em cinza) em *Acinetobacter baumannii* (1330 pb).

agcaatatctcgtataaccgctgcctctgaccatcaactgtaatatttttacgagtaataacctga
cttacatcctagatagctcagtgcatgacccaataaactgacggtttacagtctttgactg
atagttttggtttcccatctactttgataccatttttctttatactatcactgaggcaggttg
acatttgattgctagagttatttgcatttctctattttatcaaaatccaatcggtttttctt
cagcatactttttgaaacactaccaaatttttaagttgtatatcatgaaattattaaaaatat
tgagtttagtttgcttaagcataagttattggggcttgtgctgagcatagtatgagtcgagcaa
aaacaagtacaattccacaagtgaataactcaatcatcgatcagaatgttcaagcgcttttta
atgaaatctcagctgatgctgtgtttgtcacatatgatgggtcaaaatattaaaaaatatggca
cgcatttagaccgagcaaaaacagcttatattcctgcatctacatttaaaattgccaatgcac
taattgggttagaaaaatcataaagcaacatctacagaaatatttaagtgggatggaaagccac
gtttttttaaagcatgggacaaagattttactttgggcgaagccatgcaagcatctacagtgc
ctgtatatcaagaattggcacgtcgtatttgggtccaagcttaatgcaagtgaaattgcaacgta
ttggttatggcaatatgcaaataggcacggaagttgatcaattttgggtgaaagggcctttga
caattacacctatacaagaagtaaagtttgtgtatgatttagcccaagggcaattgcctttta
aacctgaagttcagcaacaagtgaagagatgttgtatgtagagcgcagagggggagaatcgtc
tatatgctaaaagtggctgggggaatggctgtagaccgcgaagtggttgggtatgtgggttttg
ttgaaaaggcagatgggcaagtggtggcatttgcctttaaatatgcaaatgaaagctgggtgatg
atattgctctacgtaaacaattgtcttttagatgtgctagataagttgggtgtttttcattatt
tataagaattagaagtttgaggttaattctatttttggtagtgtttcaaaaagtatgctgaaga
aaaagccgattggatttttgataaaatagagaaatgcaataactctagcaatcaaatgtccaa
cctgcctcagtgatagttataaagaaaaatgggtatcaaagtagatgggaaacaaaactatcagt
gcaaagactgtaaacgtcagtttattgggtgatcatgcactgagctatctaggatgtaagtcag
gtattactcgtaaaaatattacagttgatgggtcagaggcagcggtatacgagatatgtgctgaag
ttgagcgcacagtatcgggtaaagttttacgtactttaactgaatcaacctatgaaattcagc
ctcagcaaagtcattatgaatctctcgaagtagatgagttctggaattttgttggaataaaa
agaataaacaatggcttattttacgcctatcatcgagaaa

Figura 14. GenBank Accession no. FJ492877, ISAb-3 (sublinhado) na região anterior e posterior do gene *bla*_{OXA-58} (em cinza) em *Acinetobacter baumannii* (1614 pb)

ggtagttggcccccttaaaattacaccagtacaagaagttaattttgccgatgaccttgacataaac
 cgattaccttttaattagaaactcaagaagaagttaaaaaaatgcttctaattaaagaagtaaatgg
 tagtaagattttatgcaaaaagtggtatgggggaatggatgttactccacaggtaggttgggtgactgggt
 g

Figura 15. GenBank Accession no. FJ969387, gene *bla*_{OXA-72} em *Acinetobacter baumannii*. (205 pb).

4.5 Tipagem molecular

• ERIC-PCR

A amplificação dos segmentos conservados presentes no DNA bacteriano foi realizada através do ERIC-PCR, a partir do *primer* único ERIC-2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC-3' (AYDIN *et al.*, 2007), específico para estes segmentos.

Os perfis de amplificação gerados na técnica de ERIC-PCR mostraram uma diversidade clonal identificando 13 perfis diferentes nos isolados de *Acinetobacter baumannii* (**Figura 16**).

Na avaliação da similaridade genética feita por análise de *clusters*, utilizando o coeficiente de DICE, foram identificados 13 clones distintos, denominados A-M, tendo como base uma similaridade de 90%. Dois clones foram predominantes, um entre as cepas produtoras de OXA-23-like (*cluster* J) e outro entre as cepas que não produziram nenhuma das enzimas pesquisadas. (*cluster* F).

Figura 16: Dendrograma ERIC-PCR

Nota: Coeficiente de DICE, Tolerância 2%. A porcentagem de corte para as análises dos clusters foi de 90%.

Legenda: HGVP: Hospital Geral Vila Penteado, HU: Hospital Universitário, BP: Beneficência Portuguesa, HAM: Hospital Alvorada Moema, HJ: Hospital Jaraguá, HRR: Hospital Rudge Ramos, HA: Hospital Avicenna, SCM: Santa Casa de Misericórdia de Ponta Grossa (PR).

4.6 Hidrólise enzimática e inibição pelo NaCl

Primeiramente os extratos enzimáticos foram quantificados. As concentrações proteicas nos extratos variaram de 257 – 704 µg/ml, quantidades suficientes de proteína para que fosse realizada a hidrólise enzimática.

Os resultados dos ensaios de hidrólise do imipenem a partir de extratos enzimáticos obtidos de cepas que apresentavam os genes tipo *bla_{OXA}*, mostraram que apenas o extrato obtido da cepa que carregava o gene *bla_{OXA-58}* apresentou hidrólise do imipenem, caracterizada pela queda da absorbância [comprimento de onda λ_{299} (A_{299} nm)] em função do tempo (min) (**Figura 17**). Esta hidrólise foi inibida pela adição de NaCl, não sendo observada nenhuma variação nos valores de A_{299} em função do tempo.

Figura 17: Perfil de hidrólise do imipenem nos isolados que carregavam os genes *bla_{OXA}*

5. DISCUSSÃO

5.1 Considerações gerais

Com o aumento da resistência aos antimicrobianos em diversas espécies de bacilos Gram-negativos, inclusive em *Acinetobacter baumannii*, a utilização dos antibióticos carbapenêmicos como antimicrobianos de primeira escolha está sendo cada vez mais comprometida, o que tem incentivado o estudo da associação de diversos mecanismos de resistência.

No Brasil, o *Acinetobacter spp.* é um dos agentes etiológicos mais frequentes em infecções hospitalares (MENDES *et al.*, 2005; GIRAO *et al.*, 2008). Estudos multicêntricos como o SENTRY relataram, no período de 1997 a 2001, o percentual de resistência ao imipenem de 8,5% em *A. baumannii* (TOGNIM *et al.*, 2004). Já o MYSTIC, em 2002, estudou a sensibilidade antimicrobiana em UTIs de sete grandes centros médicos brasileiros e detectou uma taxa de 10,4% de resistência ao imipenem (MENDES *et al.*, 2005).

Embora relatos mostrem que o mecanismo de resistência mais estudado em *A. baumannii* seja a produção de carbapenemases (AMYES; YOUNG, 1996), os estudos realizados até o momento no Brasil, têm sido na sua maioria direcionados à caracterização de metalo-beta-lactamases (TOGNIM *et al.*, 2006).

Desta forma, o enfoque deste estudo foi o de caracterizar fenotípica e genotipicamente a produção de carbapenemases dos tipos OXA e MβL em 36 isolados de *A. baumannii* provenientes de 8 hospitais brasileiros (7 em São Paulo e 1 em Ponta Grossa, no Paraná) coletados de 2004 a 2008, os quais foram previamente identificados como resistentes ao imipenem. Os espécimes clínicos mais frequentes foram provenientes de sítios anatômicos tais como: trato respiratório (22,2%), catéter (16,6%) e trato urinário (13,8%).

5.2 Perfil de resistência das amostras testadas frente aos antimicrobianos

Os relatos de DALLA-COSTA *et al.* (2003), GALES *et al.* (2003a), LINCOPAN *et al.* (2005), SADER *et al.* (2005b) e CARVALHO *et al.* (2009) mostraram que hospitais brasileiros têm registrado um elevado número de resistência aos antibióticos carbapenêmicos nos últimos tempos. Tem sido frequente a detecção de isolados multirresistentes apresentando novos mecanismos de resistência não encontrados anteriormente.

Os resultados do presente trabalho complementam tais dados, visto que os 36 isolados de *A. baumannii* provenientes de 8 hospitais apresentaram este perfil com 100% de resistência aos antibióticos imipenem, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina e meropenem, levando-nos a acreditar que este fenótipo MR seja endêmico nestes hospitais (SAALFELD *et al.*, 2009).

A resistência verificada frente a inúmeros antibióticos levou-nos a sugerir a participação de diversos mecanismos de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, desta forma, a resistência à ciprofloxacina, observada em 100% das cepas, pode ter sido causada por mutações no gene *gyrA*, que codifica as subunidades A da DNA girase (VILA; MARCO, 2002); a resistência ao aztreonam (89%) e cefepime (69,4%) podem ter ocorrido devido à produção da enzima AmpC, capaz de conferir resistência a estes antibióticos (ABBO, 2005); a resistência aos aminoglicosídeos amicacina (66,5%) e gentamicina (30,5%) podem ter ocorrido devido à produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos do tipo acetiltransferase (AAC) combinadas com a baixa permeabilidade de membrana bacteriana (LIVERMORE, 2008).

O antibiótico com melhor atividade *in vitro* foi a ampicilina/sulbactam com 61,2% dos isolados sensíveis. Estes resultados complementam os estudos clínicos realizados por WOOD *et al.* (2002) e Evans *et al.* (1999) que demonstraram sucesso no uso de ampicilina/sulbactam para o tratamento de infecções por *A. baumannii* resistente ao imipenem, apresentando boa atividade *in vitro*, boa tolerância e poucos efeitos adversos.

No Brasil, estudos realizados para avaliar a eficácia do uso de ampicilina/sulbactam em pacientes que apresentavam infecções causadas por *Acinetobacter baumannii* multirresistentes confirmaram que esta associação de antimicrobianos foi uma boa e segura opção terapêutica no tratamento dessas infecções (LEVIN *et al.*, 2003). De fato, estudos multicêntricos relataram 81 - 100% de sensibilidade para este antibiótico em isolados clínicos de *Acinetobacter spp.* (LEVIN, 2002).

Um trabalho mais recente, realizado no Brasil, comparou a eficácia entre os antibióticos ampicilina/sulbactam e polimixina contra infecções por *Acinetobacter spp.* resistentes aos carbapenêmicos, relatando melhores resultados quando utilizaram o primeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

5.3 Triagem para produção de M β L

A triagem realizada para verificar a produção de M β L mediante sinergismo com o teste de dupla difusão com disco não mostrou resultados positivos e a triagem realizada com fitas de Etest M β L mostrou resultado falso-positivo em uma das cepas produtoras de OXA-23.

Este dado confirma os relatos de resultados falso-positivos em testes que utilizam o EDTA como inibidor enzimático, pois este pode promover redução da atividade da carbapenemase em *A. baumannii* produtor de OXA-23 (SEGAL; ELISHA, 2005), podendo ainda inibir alguns microrganismos, devido a um efeito de permeabilidade da membrana (CHU *et al.*, 2005). Desta forma, os resultados de triagem para a produção de M β L usando o EDTA como quelante, devem ser interpretados com cautela, sendo necessária a confirmação por métodos genotípicos.

5.4 Teste de Hodge

O método que obteve resultados satisfatórios na realização deste teste com *Acinetobacter baumannii* foi o que utilizou a cepa de *S. aureus* e disco de oxacilina, o

qual mostrou resultados positivos para todas as cepas produtoras de oxacilinas. O método 1 parece obter melhores resultados quando utilizado para enterobactérias. Porém, vale ressaltar a importância da confirmação dos resultados por meio de métodos moleculares.

5.5 Concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) de imipenem foi determinada para todas as cepas pelo método de diluição em ágar e alguns resultados foram confirmados por meio da fita Etest. Todas as cepas (100%) apresentaram uma CIM elevada para imipenem com valores iguais e superiores a 16 µg/mL. Resultados semelhantes foram observados nos estudos do SENTRY, os quais detectaram isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem com CIM superiores a 16 µg/mL (SADER *et al.*, 2005a). Nos estudos de GALES *et al.* (2001), a CIM de isolados nosocomiais de *A. baumannii* atingiu valores elevados para imipenem, porém não apenas em isolados multiresistentes como os deste estudo. Mais recentemente, MOSTACHIO *et al.* (2009) mostraram que as CIM dos isolados de *Acinetobacter spp.* recuperados de pacientes internados em quatro hospitais de São Paulo também apresentavam valores elevados, inclusive as CIM foram maiores em isolados produtores de MβL do tipo IMP-1 (CIM >128 µg/ml) do que nos produtores de OXA-23-like (16-128 µg/ml).

5.6 Caracterização de genes *bla*_{OXA}, IS, *bla*_{MβL}

Vários estudos têm sido realizados para esclarecer o real papel da enzima OXA-51-like, responsável pela resistência intrínseca do *A. baumannii*. A sua presença, mesmo sem estar associada a qualquer outro mecanismo de resistência, poderia aumentar ou manter diminuídos os valores das CIM dos antibióticos carbapenêmicos, tornando o microrganismo sensível ou resistente a este antimicrobiano. Esta enzima, recentemente descrita (BROWN; YOUNG; AMYES, 2005; BROWN; AMYES, 2005), está naturalmente presente em isolados de *A.*

baumannii e os genes que a codificam fazem parte do cromossomo deste microrganismo (HÉRITIER *et al.*, 2005; WOODFORD *et al.*, 2006). A explicação plausível que pesquisadores encontraram foi de que estruturas genéticas tais como sequências de inserção, normalmente responsáveis pela mobilização de genes, quando localizadas na região *upstream* do gene *bla*_{OXA}, fornecem um promotor transcricional que regula a expressão destes genes (CORVEC *et al.*, 2007; POIREL; NORDMANN, 2006).

As sequências de inserção do tipo IS*Aba*-1 têm sido encontradas na região *upstream* dos genes *bla*_{OXA-51}-like e *bla*_{OXA-23}-like (CORVEC *et al.*, 2003; SEGAL; NELSON; ELISHA, 2004, SEGAL *et al.*, 2005), enquanto IS do tipo IS*Aba*-3 podem estar tanto na região *upstream* como *downstream* dos genes *bla*_{OXA-58}-like (SHELBURNE *et al.*, 2008).

Neste trabalho, todos os isolados de *A. baumannii* apresentaram o gene *bla*_{OXA-51}-like e as sequências de inserção IS*Aba*-1, porém não foi observada colinearidade entre ambos os genes, portanto o gene *bla*_{OXA-51} não esteve associado com o fenótipo de resistência ao imipenem nos isolados estudados, ao contrário do que foi relatado por SHELBURNE *et al.* (2008), estudo no qual a IS*Aba*-1 esteve localizada na região anterior deste gene, contribuindo para o aumento da CIM dos antibióticos carbapenêmicos.

A produção de carbapenemases do tipo OXA-23 tem sido um dos mecanismos de resistência crescente e predominante em isolados de *Acinetobacter baumannii* recuperados de hospitais brasileiros. De fato, OXA-23 tem sido responsável pelo fenótipo de multirresistência em amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas em diversos hospitais de São Paulo, Rio de Janeiro e Porto Alegre (MOSTACHIO *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2009), produzindo surtos fatais de infecção em Curitiba e Ponta Grossa (DALLA-COSTA *et al.*, 2003; ANTONIO *et al.*, 2008a; ANTONIO *et al.*, 2008b). Neste trabalho, a presença desta enzima também foi predominante, fazendo-se presente em 41,6% dos isolados. Em todas as amostras que apresentavam o gene *bla*_{OXA-23}, a sequência de inserção IS*Aba*-1 esteve localizada na sua região anterior, semelhante ao que ocorreu nos estudos de ZHOU *et al.* (2007).

A presença da enzima OXA-58 já foi relatada em vários países, inclusive da Europa (MARQUE *et al.*, 2005) e América Latina (POIREL *et al.*, 2005b; MERKIER *et al.*, 2008), porém no Brasil este estudo descreve o primeiro relato desta enzima detectada em um isolado de um paciente que esteve internado, em 2004, com infecção causada por *Acinetobacter baumannii* multirresistente em um Hospital Universitário da cidade de São Paulo. Assim como nos estudos de SHELBURNE *et al.* (2008), os isolados deste trabalho que apresentaram o gene *bla*_{OXA-58} tiveram a sequência de inserção IS*Aba*-3 localizada nas regiões anterior e posterior do gene.

O gene *bla*_{OXA-72} foi encontrado pela primeira vez em 2004 na Tailândia, causando altos níveis de resistência em isolados de *A. baumannii* (LU *et al.*, 2009). No Brasil, este gene ainda não foi descrito, sendo este achado o seu primeiro relato, no qual esteve presente em dois isolados relacionados com infecções de 2 pacientes internados em um hospital de queimados, em 2007, na cidade de São Paulo. Os isolados deste trabalho que apresentaram o gene *bla*_{OXA-72} estiveram associados com um elevado perfil de resistência ao imipenem (32 µg/mL e 64 µg/mL) sem mostrar associação com nenhuma das sequências de inserção testadas (IS*Aba*-1 e IS*Aba*-3).

Alguns relatos consideram que os genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-72} estão localizados em plasmídeos (POIREL; NORDMANN, 2006; LU *et al.*, 2009), porém as tentativas de transferência desses genes realizadas por meio de transformação não tiveram êxito, possivelmente devido às células receptoras não serem compatíveis com os ensaios de transferência realizados.

Após caracterizações genotípicas não foi identificada a presença das MβLs VIM, IMP e SIM nos isolados utilizados neste estudo, porém, desde 2003 (GALES *et al.*, 2003a), vários relatos de ocorrência destas enzimas (IMP-1) têm sido descritos em isolados de *Acinetobacter baumannii* de hospitais brasileiros (SADER *et al.*, 2005a, TOGNIM *et al.*, 2006).

5.7 Tipagem genética

A técnica do ERIC-PCR foi escolhida para a verificação da diversidade clonal por apresentar boa capacidade discriminatória, reprodutibilidade, fácil interpretação, rapidez e baixo custo (SYRMIS *et al.*, 2004, PUJANA *et al.*, 1999, RENDERS *et al.*, 1996). Seu poder discriminatório é considerado comparável ao do PFGE na tipagem de *Acinetobacter baumannii* (SILBERT *et al.*, 2004).

Neste estudo, observou-se uma grande diversidade genética entre os isolados estudados com a identificação de 13 *clusters*, dos quais 2 foram predominantes. O *cluster* F foi predominante entre as cepas que não apresentaram nenhuma das enzimas pesquisadas, já o *cluster* J foi predominante entre as cepas produtoras de OXA-23, caracterizando uma disseminação clonal proveniente de um surto hospitalar ocorrido em 2008 na cidade de Ponta-Grossa (PR). Neste mesmo estado, surgiram os primeiros relatos da enzima OXA-23 em *A. baumannii* no Brasil, em isolados de dois hospitais de Curitiba, onde foi observada a predominância de um mesmo clone (DALLA-COSTA *et al.*, 2003).

Foi identificada a presença de um mesmo *cluster* (A, G e H) em diferentes hospitais, sugerindo uma possível disseminação clonal inter-hospitalar. Os determinantes de resistência envolvidos nesta disseminação provavelmente foram transmitidos horizontalmente, o que favoreceu supostamente o fato deste microrganismo ter se tornado endêmico nesses hospitais.

Por outro lado, foi verificada a presença de vários *clusters* em isolados de um mesmo hospital, sugerindo que estes genes de resistência também podem estar associados com uma disseminação policlonal.

5.8 Hidrólise enzimática e inibição pelo NaCl

Após a tentativa de verificação de hidrólise do imipenem nos isolados que apresentavam os genes *bla*_{OXA}, foi possível a detecção de hidrólise apenas no isolado que carregava o gene *bla*_{OXA-58}. O estudo de hidrólise do imipenem foi avaliado após extração enzimática pelos métodos congelamento/descongelamento e

sonicação, obtendo-se resultados negativos para os isolados portadores dos genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-72}. Este dado foi curioso, porém a literatura tem reportado uma fraca atividade hidrolítica *in vitro* por parte de algumas enzimas do tipo OXA (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006; NIUMSUP *et al.*, 2009). Esta fraca ou ausente atividade enzimática *in vitro* pode ser baseada em mudanças conformacionais da proteína, decorrentes de estados monoméricos ou diméricos, dirigidos por propriedades físico-químicas no meio em que estas enzimas encontram-se imersas. Tem sido reportado que dímeros são ativos, enquanto que os monômeros são inativos. Assim é muito provável que o meio periplásmico da bactéria contribua para a formação de dímeros que quando extraídos em condições experimentais adquirem formas monoméricas inativas. (FRANCESCHINI *et al.*, 2001; GIRLICH; NAAS; NORDMANN, 2004; DANIEL; FRÈRE; LIVERMORE, 2001).

Foi possível ainda pesquisar a ocorrência de hidrólise do imipenem nos isolados que não apresentavam os genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-72}, e em nenhuma das cepas foi verificada hidrólise do imipenem, portanto isso reforça a possibilidade da presença de outros mecanismos envolvidos na resistência a este antimicrobiano.

Como citado previamente, os extratos enzimáticos dos isolados variaram de 257 a 704 µg/ml, mostrando que a ausência de hidrólise não esteve associada com uma baixa concentração de proteína quantificada nos extratos. Em contrapartida a hidrólise do imipenem foi exclusivamente associada com a presença de *bla*_{OXA-58}, cujo extrato apresentou uma concentração de 315 µg/ml de proteína, concentração esta, mais baixa que alguns extratos de isolados carregando *bla*_{OXA-23}. Como citado na literatura, esta enzima tem uma alta afinidade e atividade hidrolítica contra este antibiótico (HÉRITIER *et al.*, 2005a).

Embora alguns métodos utilizem o NaCl na identificação laboratorial de *Acinetobacter baumannii* produtor de oxacilinase (POIREL; NORDMANN, 2006a), há controvérsias à respeito do seu uso como inibidor das oxacilinas, visto que alguns estudos mostram a sua eficácia na inibição de algumas oxacilinas, como a OXA-58 (POIREL *et al.*, 2004), concordando com os resultados deste trabalho, enquanto outros mostram resistência dessas enzimas à essa inibição, como os estudos de HÉRITIER *et al.* (2003).

5.9 Considerações finais

A expressão de carbapenemases do tipo OXA é um mecanismo de resistência muito frequente em isolados de *Acinetobacter baumannii*, visto que 18/36 (50%) isolados imipenem resistentes recuperados de 8 centros médicos apresentaram esta enzima e nenhuma foi positiva para a produção de M β L. Estes resultados complementam os estudos recentes de CARVALHO *et al.* (2009) que detectaram, em 87% dos 110 isolados de *A. baumannii* de oito hospitais do Rio de Janeiro, a presença de *bla*_{OXA-23} e os de MOSTACHIO *et al.* (2009) que, ao pesquisar genes de resistência em 64 isolados de *Acinetobacter spp.* resistentes aos carbapenems de quatro hospitais de São Paulo, no período de 2002-2008, verificaram maior incidência de cepas produtoras de OXA-23 (34%) do que produtoras de IMP-1 (6%). Portanto, esta incidência deve ser considerada motivo de preocupação para a equipe médica, pois a disseminação da enzima OXA já é um problema no Brasil e tem ocorrido de maneira ampla e rápida.

A predominância de sequências de inserção nesta espécie, associada com a mobilização e expressão dos genes *bla*_{OXA}, deve contribuir para um alto índice de morbimortalidade, alertando a comunidade médica à respeito deste novo evento que pode ser responsável pelo aparecimento de novos surtos fatais.

A disseminação de cepas multirresistentes reforça a necessidade de pesquisar outros mecanismos de resistência, assim como novas variantes de enzimas que estejam eventualmente circulando e ainda não foram detectadas, como foi o caso da *bla*_{OXA-58} e da *bla*_{OXA-72}, que circulam no país desde 2004 e 2007, respectivamente e somente agora foram feitos os primeiros relatos destas variantes. Paralelamente, deve ser realizado um controle no uso de antimicrobianos, contribuindo para evitar a falta de opções terapêuticas, assim como o agravamento na questão da saúde pública que tem ocorrido em decorrência da disseminação de cepas produtoras de enzimas responsáveis por fenótipos de multirresistência, como é o caso da *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC (MONTEIRO *et al.*, 2009) e CTX-M (BONNET *et al.*, 2000), *Pseudomonas aeruginosa* produtora de SPM-1

(TOLEMAN *et al.*, 2002) e *Acinetobacter baumannii* produtor de OXA-23 (DALLA-COSTA *et al.*, 2003; ANTONIO *et al.*, 2008a).

Considerando o alto nível de resistência não associado com a produção de OXA e M β L, os resultados fenotípicos e genotípicos obtidos neste trabalho sugerem que mais de um mecanismo pode estar envolvido com o fenótipo de multirresistência e não apenas as enzimas estudadas. A produção de uma ESBL, a GES-11, tem sido responsável pelo fenótipo de resistência aos carbapenems nestes microrganismos (MOUBARECK *et al.*, 2009). Da mesma forma, as proteínas de membrana externa, dentre elas a CarO, citadas em vários relatos como responsáveis por resistência aos carbapenems em isolados de *A. baumannii* (LIMANSKY *et al.*, 2002; QUALE *et al.*, 2003; BOU *et al.*, 2000; DEL MAR TOMAS, 2005). A redução na expressão das Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBPs) é outro mecanismo associado com este fenótipo, como foi descrito por FERNANDEZ-CUENCA *et al.* (2003) após identificarem uma redução na expressão da PBP-2 em isolados de *A. baumannii* em Sevilla, na Espanha.

Finalmente, os resultados deste trabalho sugerem que a aquisição da resistência ao imipenem dos isolados de *A. baumannii* recuperados de hospitais do Sudeste e Sul do Brasil, ocorre principalmente pela expressão de genes *bla*_{OXA} associados com a disseminação de diferentes clones, sendo muito provável que esta disseminação seja facilitada pela presença de ISs e plasmídeos associados.

6. CONCLUSÕES

- ❖ Ao redor de um terço dos isolados de *A. baumannii* presentes neste estudo apresentaram CIM que variou de 16 µg/mL a valores superiores a 64 µg/mL;
- ❖ A atividade de hidrólise do imipenem com e sem NaCl foi verificada apenas no isolado que carregava o gene *bla*_{OXA-58} e pouca ou nenhuma atividade para amostras que carregavam outros genes *bla*_{OXA};
- ❖ Não foi detectada a presença de nenhum gene que codifica variantes das enzimas metalo-β-lactamases;
- ❖ Todos os isolados apresentaram o gene *bla*_{OXA-51}, confirmando sua presença intrínseca nesta bactéria;
- ❖ Foram identificados os genes responsáveis pela codificação das enzimas carbapenemases do tipo serina OXA-23 (41,6%), OXA-58 (2,7%) e OXA-72 (5,5%), sendo as duas primeiras associadas com as sequências de inserção, ISAb_a-1 e ISAb_a-3, respectivamente;
- ❖ Todos os isolados de *Acinetobacter baumannii* que carregavam o gene *bla*_{OXA-23}, mostraram a presença do elemento de mobilização ISAb_a-1 localizado na sua região anterior;
- ❖ Este trabalho mostrou ainda o elemento de mobilização ISAb_a-3 localizado nas regiões anterior e posterior do gene *bla*_{OXA-58}, ainda não descrito em nosso país;
- ❖ Foi encontrada uma nova variante dos genes *bla*_{OXA-24-like}, o gene *bla*_{OXA-72} em isolados de dois pacientes, ainda não descritos no Brasil até o momento;
- ❖ A análise de *clusters* resultou na identificação de 13 clones distintos, de acordo com a similaridade de 90%. A relação clonal foi positiva para as cepas que

possuíam o gene *bla*_{OXA-23}. Esta análise identificou, ainda, uma disseminação policlonal inter-hospitalar na cidade de São Paulo.

7. REFERÊNCIAS

- ABBO, A.; NAVON-VENEZIA, S.; HAMMER-MUNTZ, O.; KRICHALI, T.; SIEGMAN-IGRA, Y.; CARMELI, Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Emerging Infectious Diseases**, v11, p.22-29, 2005.
- AFZAL-SHAH, M.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.583–588, 2001.
- AMBLER, R.P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society, B: Biological Sciences**, v.289, n.1036, p.321-331, 1980.
- AMYES, S.G.; YOUNG, H.K. Mechanism of antibiotic resistance in *Acinetobacter spp.* -genetics of resistance. In: BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; JOLY-GUILLOU, M.L., eds. **Acinetobacter**. microbiology, epidemiology, infections, management. Boca Raton: CRC Press, 1996. p.185-223.
- ANTONIO, C.S.; TOMAZ, M.; CAVINA, F.; TERASAWA, L.B.; ITO, C.S.; GASPAR, M.R.; BUSATO, C.R.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M. Surto por *Acinetobacter baumannii* multirresistente: caracterização de genes *bla_{OXA}* e seu entorno genético. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.1-264, 2008a. [Congresso Brasileiro de Controle de Infecção Hospitalar e Epidemiologia Hospitalar, 11, Rio de Janeiro, 2008].
- ANTONIO, C.S.; CAVINA, F.; TERASAWA, L.B.; ITO, C.S.; GASPAR, M.; BUSATO, C.R.; MAMIZUKA E.M.; LINCOPAN, N. An outbreak of multirresistant *Acinetobacter baumannii*: characterization of *bla_{OXA}*-like genes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA, 1, Gramado, 2008. **Resumos**. Gramado, 2008b. 1 CD-ROOM.
- ANTONIO, C.S.; NEVES, P.; MAMIZUKA E.M.; LINCOPAN, N. Disseminação e emergência de genes *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-58}*, *bla_{OXA-72}* e sequências de inserção (IS) em isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. In: 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, Porto de Galinhas, 2009. **Resumos**. Porto de galinhas, 2009.
- ANTONIO, C.S.; NEVES, P.; MAMIZUKA, E.M.; LINCOPAN, N. First report of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying *bla_{OXA-72}* and *bla_{OXA-58}* genes in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2010. [Letter] [No Prelo].
- APPELBAUM, P.C.; TAMIM, J.; STAVITZ, J.; ABER, R.C.; PANKUCH, G.A. Sensitivity of 341 non-fermentative gram-negative bacteria to seven betalactam antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology**, v.1, n.3, p.159–165, 1982.
- APPELBAUM, P.C.; SPANGLER, S.K.; SOLLENBERGER, L. Susceptibility of non-fermentative gram-negative bacteria to ciprofloxacin, norfloxacin, amifloxacin, pefloxacin and cefpirome. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.18, p.675–679, 1986.
- ARONSON, N.E.; SANDERS, J.W.; MORAN, K.A. In harm's way: infections in deployed American military forces. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, p.1045–1051, 2006.
- AUBERT, D.; NAAS, T.; HÉRITIER, C.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of β -lactam resistance genes. **Journal of Bacteriology**, v.188, p.6506-6514, 2006.

- AYDIN, F.; GUMUŞSOY, K.S.; ATABAY, H.I.; IÇA, T.; ABAY, S. Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.1, p.27-35, 2007.
- BARKER, K.F. Antibiotic resistance: a current perspective. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.48, p.109–24, 1999.
- BENNETT, P.M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, n.1, p.1-4, 1999.
- BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, p.148–165, 1996.
- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res**, v.7, n. 6, p.1513–1523, 1979.
- BONNET, R.; SAMPAIO, J.L.M.; LÁBIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.7, p.1936-1942, 2000.
- BOU, G.; CERVERO, G.; DOMINGUEZ, M.A.; 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 β -lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3299-3305, 2000.
- BOU, G.; MARTINEZ-BELTRAN, J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.428–432, 2000.
- BOU, G.; OLIVER, A.; MARTINEZ-BELTRAN, J. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.1556–1561, 2000.
- BOUVET, P.J.; GRIMONT, P.A. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp and *Acinetobacter junii* sp and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, n.2, p.228-240, 1986.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.
- BROOKS, S.E.; WALCZAK, M.A.; HAMEED, R. Are we doing enough to contain *Acinetobacter* infections. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.21, p.304, 2000. [Letter].
- BROWN, S.; YOUNG, H.K.; AMYES, S.G. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p.15–23, 2005.
- BROWN, S.; AMYES, S.G. The sequences of seven class D β -lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p.326–329, 2005.

- BROWN, S.; AMYES, S. OXA β -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.1-3, 2006.
- BUISSON, Y.; TRAN, V.A.N.; NHIEU, G.; GINOT, L.; BOUVET, P.; SCHILL, H.; DRIOT, L.; MEYRAN, M. Nosocomial outbreaks due to amikacin-resistant tobramycin-sensitive *Acinetobacter* species: correlation with amikacin usage. **Journal of Hospital Infection**, v.15, n.1, p.83-93, 1990.
- BUSH, K.; SINGER, S.B. Effective cooling allows sonication to be used for liberation of β -lactamases from Gramnegative bacteria. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.24, n.1, p.82-84, 1989.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.1211-1233, 1995.
- CANDUELA, M.J.; GALLEGU, L.; SEVILLANO, E.; VALDERREY, C.; CALVO, F.; PÉREZ, J. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from elderly patients with respiratory tract infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.1220–1222, 2006.
- CARVALHO, K.R.; CARVALHO-ASSEF, A.P.; PEIRANO, G.; SANTOS, L.C.; PEREIRA, M.J.; ASENSI, M.D. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla (OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.34, n.1, p.25-28, 2009.
- CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; SCHMIDT, F.J.; WALSH, T.R. Molecular characterization of a β -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.12, p.4654-4661, 2004.
- CEFAI, C.; RICHARDS, J.; GOULD, F.K.; MCPEAKE, P. An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilatory equipment. **Journal of Hospital Infection**, v.15, p.177-182, 1990.
- CELENZA, G.; PELLEGRINI, C.; CACCAMO, M.; SEGATORE, B.; AMICOSANTE G.; PERILLI, M. Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.975–978, 2006.
- CHANDLER, M.; MAHILLON, J. Insertion sequences revisited. In: CRAIG, R.; CRAIGIE, G.M.; LAMBOWITZ, A.M. eds. **Mobile DNA II**. Washington: ASM Press, 2002. p.305-366.
- CHOI, C.H.; HYUN, S.H.; LEE, J.Y.; LEE, J.S.; LEE, Y.S.; KIM, S.A.; CHAE, J.-P.; YOO, S.M.; LEE, J.C. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. **Cellular Microbiology**, v.10, n.2, p.309-319, 2008.
- CHU, Y.W.; CHEUNG, T.K.; NGAN, J.Y.W.; KAM, K.M. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem-EDTA disk method. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, p.340–341, 2005.
- CISNEROS, J.M.; REYES, M.J.; PACHON, J.; BECERRIL, B.; CABALLERO, F.J.; GARCIA-GARMENDIA, J.L.; ORTIZ, C.; COBACHO, A.R. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, n.6, p.1026–1032, 1996.
- CISNEROS, J.M.; BAÑO, J.R. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, n.11, p.687-693, 2002.

CISNEROS, J.M.; RODRIGUEZ-BANO, J.; FERNANDEZ-CUENCA, F.; RIBERA, A.; VILA, J.; PASCUAL, A.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; BOU, G.; PACHON, J. Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, n.11, p.874–879, 2005.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standard for antimicrobial susceptibility testing**. 16.ed. Wayne: CLSI, 2006. (Document M100-S16).

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standard for antimicrobial susceptibility testing**. Wayne: CLSI, 2009. (Document M100–S19).

COELHO, J.M.; WOODFORD, N.; TURTON, J.; LIVERMORE, D.M. Multiresistant *Acinetobacter* in the UK: how big a threat? **Journal of Hospital Infection**, v.58, p.167-169, 2004.

COELHO, J.M.; WOODFORD, N.; AFZAL-SHAH, M.; LIVERMORE, D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter spp.* collected over 10 years in three continents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.2, p.756-758, 2006.

COLLIS, C.M.; HALL, R.M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.1, p.155-162, 1995.

CORBELLA, X.; MONTERO, A.; PUJOL, M.; DOMINGUEZ, M.A.; AYATS, J.; ARGERICH, M.J.; GARRIGOSA, F.; ARIZA, J.; GUDIOL, F. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.11, p.4086–4095, 2000.

CORVEC, S.; CAROFF, N.; ESPAZE, E.; GIRAUDAU, C.; DRUGEON, H.; REYNAUD, A. AmpC hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.629–635, 2003.

CORVEC, S.; POIREL, L.; NAAS, T.; DRUGEON, H.; NORDMANN, P. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.1530–1533, 2007.

COSTA, S.F.; WOODCOCK, J.; GILL, M.; WISE, R.; BARONE, A.A.; CAIAFFA, H.; LEVIN, A.S.S. Outer-membrane proteins pattern and detection of beta-lactamases in clinical isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.13, n.3, p.175–182, 2000.

CROMBACH, W.H.; DIJKSHOORN, L.; VAN NOORT-KLAASSEN, M.; NIESSEN, J.; VAN KNIPPENBERG-GORDEBEKE, G. Control of an epidemic spread of a multi-resistant strain of *Acinetobacter calcoaceticus* in a hospital. **Intensive Care Medicine**, v.15, p.166-170, 1989.

DA SILVA, G.J.; CORREIA, M.; VITAL, C.; RIBEIRO, G.; SOUSA, J.C.; LEITAO, R.; PEIXE, L.; DUARTE, A. Molecular characterization of *bla*_{IMP-5}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. **FEMS Microbiology Letters**, v.215, n.1, p.33-39, 2002.

DALLA-COSTA, L.M.; COELHO, J.M.; SOUZA, H.A.P.H.M.; CASTRO, M.E.S.; STIER, C.J.N.; BRAGAGNOLO, K.L.; REA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S.R.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.7, p.3403-3406, 2003.

DANEL, F.; FRÈRE J.M.; LIVERMORE D.M. Evidence of dimerisation among class D β-lactamases: kinetics of OXA-14 β-lactamase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1546, l. 1, p. 132-142. 2001.

- DAVIS, K.A.; MORAN, K.A.; MCALLISTER, C.K.; GRAY, P.J. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.1218–1224, 2005.
- DEL MAR TOMAS, M.; CARTELLE, M.; PERTEGA, S.; BECEIRO, A.; LLINARES, P.; CANLE, D.; MOLINA, F.; VILLANUEVA, R.; CISNEROS, J.M.; BOU, G. Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, n.7, p.540–546, 2005.
- DONALD, H.M.; SCAIFE, W.; AMYES, S.G.B.; YOUNG, H.-K. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.1, p.196–199, 2000.
- DUPONT, M.J.; PAGES, M.; LAFITTE, D.; SIROY, A.; BOLLET, C. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Proteome Research**, v.4, p.2386–2390, 2005.
- DORSEY, C.W.; BEGLIN, M.S.; ACTIS, L.A. Detection and analysis of iron uptake components expressed by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.4188–4193, 2003.
- DOS ANJOS BORGES, L.G.; DALLA VECCHIA, V.; CORÇÃO, G. Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 45, n.2, p. 173-180, 2003.
- ENDIMIANI, A.; LUZZARO, F.; MIGLIAVACCA, R.; MANTENGOLI, E.; HUJER, A.M.; HUJER, K.M.; PAGANI, L.; BONOMO, R.A.; ROSSOLINI, G.M.; TONIOLO, A. Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.2211–2214, 2007.
- EVANS, M.E.; FEOLA, D.J.; RAPP, R.P. Polymyxin B sulfate and Colistin: old antibiotics for emerging multiresistant Gram-negative bacteria. **Annals of Pharmacotherapy**, v.33, p.960-967, 1999.
- FALAGAS, M.E.; BLIZIOTIS, I.A.; SIEMPOS, I.I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. **Critical Care**, v.10, p.R48, 2006.
- FASS, R.J.; BARNISHAN, J. *In vitro* susceptibilities of nonfermentative gram-negative bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* to 32 antimicrobial agents. **Reviews of Infectious Diseases**, v.2, p.841–853, 1980.
- FERNANDEZ-CUENCA, F.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; CONEJO, M.C.; AYALA, J.A.; PEREA, E.J.; 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*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p.565–574, 2003.
- FIEROBE, L.; LUCET, L.C.; DECRÉ, D.; MULLER-SERIEYS, C.; DELEUZE, A.; JOLY-GUILLOU, M.L.; MANTZ, J.; DESMONTS, J.M. An outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill surgical patients. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.22, n. 1, p.35–40, 2001.
- FOURNIER, P.E.; RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, p.692–699, 2006.
- FOURNIER, P.E.; VALLENET, D.; BARBE, V.; AUDIC, S.; OGATA, H.; POIREL, L.; RICHET, H.; ROBERT, C.; MANGENOT, S.; ABERGEL, C.; NORDMANN, P.; WEISSENBAACH, J.; RAOULT, D.; CLAVERIE, J.-M. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS Genetics**, v.2, n.1, p.62–72, 2006.

- FRANCESCHINI, N.; BOSCHI L.; POLLINI, S.; HERMAN, R.; PERILLI, M.; GALLEN, M.; FRÈRE, J.M.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G.M. Characterization of OXA-29 from *Legionella (Fluoribacter) gormanii*: molecular class D beta-lactamase with unusual properties. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.12, p.3509-3516. 2001.
- GALES, A.C.; JONES, R.N.; FORWARD, K.R.; LINARES, J.; SADER, H.S.; VERHOEF, J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). **Clinical Infectious Diseases**, v.15, suppl.2, p.104–113, 2001.
- GALES, A.C.; TOGNIM, M.C.; REIS, A.O.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.45, p.77-79, 2003a.
- GALES, A.C.; MENEZES, L.C.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.45, p.77-79, 2003b.
- GIRLICH, D.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n.6, p. 2043-2048. 2004.
- GO, E.S.; URBAN, C.; BURNS, J.; KREISWIRTH, B.; EISNER, W.; MARIANO, N.; MOSINKA-SNIPAS, K.; RAHAL, J.J. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. **Lancet**, v.344, n.8933, p.1329-1332, 1994.
- GOIC-BARISIC, I.; BEDENIC, B.; TONKIC, M.; NOVAK, A.; KATIC, S.; KALENIC, S.; PUNDA-POLIC, V.; TOWNER, K.J. Occurrence of OXA-107 and ISAb1 in carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* from Croatia. **J Clin Microbiol**, v.47, n.10, p.3348-3349, 2009.
- GOLDSTEIN, F.W.; LABIGNE-ROUSSEL, A.; GERBAUD, G.; CARLIER, C.; COLLATZ, E.; COURVALIN, P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. **Plasmid**, v.10, n.2, p.138–147, 1983.
- GROSSO, F.; QUINTEIRA, S.; PEIXE, L. Characterisation of *bla*OXA-40-carrying plasmids among *Acinetobacter* spp. isolates in Portuguese hospitals. In: EUROPEAN CONGRESS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES, 19, Helsinki, 2009. **Abstracts**. Helsinki, 2009. abstr.P1705.
- GUPTA, V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.17, n.2, p.131-143, 2008.
- HARRIS, A.; VIEIRA, T.C.; VENKATARAMAN, L.; DE IROLAMI, P.; SAMORE, M.; CARMELI, Y. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v.28, p.1128-1133, 1999.
- HENWOOD, C.J.; GATWARD, T.; WARNER, M.; JAMES, D.; STOCKDALE, M.W.; SPENCE, R.P.; TOWNER, K.J.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* in the UK, and *in vitro* evaluation of tigecycline (GAR-936). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, n.3, p.479–487, 2002.
- HÉRITIER, C.; POIREL, L.; AUBERT, D.; NORDMANN, P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.1, p.268–273, 2003.

- HÉRITIER, C.; POIREL, L.; FORMIER, P.-E.; CLAVERIE, J.-M.; RAOULT, D.; NORDMANN, P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.10, p.4174–4179, 2005a.
- HÉRITIER, C.; DUBOUX, A.; POIREL, L.; MARTY, N.; NORDMANN, P. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenemhydrolysing oxacillinase OXA-58. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, n.1, p.115–118, 2005b.
- HÉRITIER, C.; POIREL, L.; LAMBERT, T.; NORDMANN, P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolysing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.8, p.3198–3202, 2005c.
- HÉRITIER, C.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, p.123–130, 2006.
- HIGGINS, P.G.; POIREL, L.; LEHMANN, M.; NORDMANN, P.; SEIFERT, H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.12, p.5035–5038, 2009.
- HIGGINS, P.G.; DAMMHAYN, C.; HACKEL, M.; SEIFERT, H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.65, n.2, p. 233–238, 2010.
- HOBAN, D.J.; JONES, R.N.; YAMANE, N.; FREI, R.; TRILLA, A.; PIGNATARI, A.C. *In vitro* activity of three carbapenem antibiotics: comparative studies with biapenem (L-627), imipenem, and meropenem against aerobic pathogens isolated worldwide. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.17, p.299–305, 1993.
- HODGE, W.; CIAK, J.; TRAMONT, E.C. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.7, p.102–103, 1978.
- HUANG, Z.M.; MAO, P.H.; CHEN, Y.; WU, L.; WU, J. Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v.25, p.425–427, 2004.
- HUJER, K.M.; HAMZA, N.S.; HUJER, A.M.; PEREZ, F.; HELFAND, M.S.; BETHEL, C.R.; THOMSON, J.M.; ANDERSON, V.E.; BARLOW, V.; RICE, L.B.; TENOVER, F.C.; BONOMO, R.A. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 β -lactamase: defining a unique family of class C enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.2941–2948, 2005.
- HUJER, K.M.; HUJER, A.M.; HULTEN, E.A.; BAJAKSOUZIAN, S.; ADAMS, J.M.; DONSKEY, C.J.; ECKER, D.J.; MASSIRE, C.; ESHOO, M.W.; SAMPATH, R.; THOMSON, J.M.; RATHER, P.N.; CRAFT, D.W.; FISHBAIN, J.T.; EWELL, A.J.; JACOBS, M.R.; PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter sp.* isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.4114–4123, 2006.
- JANKOWSKI, S.; GRZYBEK-HRYNCEWICZ, K.; FLEISCHER, M.; WALCZUK, M. Susceptibility of isolates of *Acinetobacter anitratus* and *Acinetobacter lwoffii* to the bactericidal activity of normal human serum. **FEMS Microbiology Immunology**, v.4, p.255–260, 1992.
- JIN, W.; ARAKAWA, Y.; YASUZAWA, H.; TAKI, T.; HASHIGUCHI, R.; MITSUTANI, K.; SHOGA, A.; YAMAGUCHI, Y.; KUROSAKI, H.; SHIBATA, N.; OHTA, M.; GOTO, M. Comparative study of the Inhibition of Metallo- β -Lactamases (IMP-1 and VIM-2) by thiol compounds that contain a hydrophobic group. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.6, p.851–856, 2004.

- JOLY-GUILLOU, M.L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p.868–873, 2005.
- KATO, N.; YAMAZOE, K.; HAN, C.G.; OHTSUBO, E. New insertion sequence elements in the upstream region of *cfiA* in imipenem-resistant *Bacteroides fragilis* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.3, p.979–985, 2003.
- KNAPP, S.; WIELAND, C.W.; FLORQUIN, S.; PANTOPHLET, R.; DIJKSHOORN, L.; TSHIMBALANGA, N.; AKIRA, S.; VAN DER POLL, T. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.173, n.1, p.122–129, 2006.
- KWON, K.T.; OH, W.S.; SONG, J.H.; CHANG, H.H.; JUNG, S.I.; KIM, S.W.; RYU, S.Y.; HEO, S.T.; JUNG, D.S.; RHEE, J.Y. Impact of imipenem resistance on mortality in patients with *Acinetobacter* bacteraemia. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, p.525–530, 2007.
- KOELEMAN, J.G.M.; PARLEVLIET, G.A.; DIJKSHOORN, L.; SAVELKOU, P.H.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M. Nosocomial outbreak of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a surgical ward: epidemiology and risk factors for acquisition. **Journal of Hospital Infection**, v.37, n.2, p.113–123, 1997.
- KOELEMAN, J.G.M.; VAN DER BIJL, M.W.; STOOF, J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; SAVELKOU, P.H. Antibiotic resistance is a major risk factor for epidemic behavior of *Acinetobacter baumannii*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.22, n.5, p.284–288, 2001.
- KULKOSKY, J.; JONES, K.S.; KATZ, R.A.; MACK, J.P.; SKALKA, A.M. Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. **Molecular and Cellular Biology**, v.12, p.2331–2338, 1992.
- LAHEY CLINIC. **Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases**. Disponível em: <http://www.lahey.org:80/studies>. Acesso em: 10 set. 2009.
- LAURETTI, L.; RICCIO, M.L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G.M. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.7, p.1584–1590, 1999.
- LEE, K.; CHONG, Y.; SHIN, H.B.; KIM, Y.A.; YONG, D.; YUM, J.H. Modified hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clinical Microbiology and Infection**, v.7, n.2, p.88–91, 2001.
- LEE, K.; LIM, Y.S.; YONG, D.; YUM, J.H.; CHONG, Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.10, p.4623–4629, 2003.
- LEE, K.; YUM, J.H.; YONG, D.; LEE, H.M.; KIM, H.D.; DOCQUIER, J.-D.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla_{SIM-1}*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.11, p.4485–4491, 2005.
- LEE, S.C.; HUA, C.C.; YU, T.J.; SHIEH, W.B.; SEE, L.C. Risk factors of mortality for nosocomial pneumonia: importance of initial anti-microbial therapy. **Int J Clin Pract**. V. 59, p.39–45, 2005.

- LEE, K.; KIM M.N.; CHOI, T.Y.; CHO, S.E.; LEE, S.; WHANG, D.H., *et al.* Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. **Int J Antimicrob Agents**, v. 33, p. 520-524, 2009.
- LEVIN, A.S.; MENDES, C.M.; SINTO, S.I.; SADER, H.S.; SCARPITTA, C.R.; RODRIGUES, E.; SAUAIA, N.; BOULOS, M. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Sao Paulo, Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.17, p.366–368, 1996.
- LEVIN, A.S.; BARONE, A.A.; PENCO, J.; SANTOS, M.V.; MARINHO, I.S.; ARRUDA, E.A.G.; MANRIQUE, E.I.; COSTA, S.F. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Infectious Diseases**, v.28, n.5, p.1008–1011, 1999.
- LEVIN, A.S. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, n.11, p.144-153, 2002.
- LEVIN, A.S.; LEVY, C.E.; MANRIQUE, A.E.; MEDEIROS, E.A.; COSTA, S.F. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, n.1, p.58-62, 2003.
- LIMANSKY, A.S.; MUSSI, M.A.; VIALE, A.M. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.4776–4778, 2002.
- LINCOPAN, N.; MCCULLOCH, J.A.; REINERT, C.; CASSETTARI, V.C.; GALES, A.C.; MAMIZUKA, E.M. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.1, p.516-519, 2005.
- LINCOPAN, N.; LEIS, R.; VIANELLO, M.A.; ARAÚJO, M.R.; RUIZ, A.S.; MAMIZUKA, E.M. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, pt.11, p.1611-1613, 2006.
- LINCOPAN, N. Endemicidade de *Acinetobacter baumannii* multirresistente em um hospital de Belo Horizonte. São Paulo, 2010 [comunicação pessoal].
- LIVERMORE, D.M. Epidemiology of antibiotic resistance. **Intensive Care Medicine**, v.26, p.S14-S21, 2000.
- LIVERMORE, D.M. The impact of carbapenemases in antimicrobial development and therapy. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v.3, n.2, p.218-224, 2002.
- LIVERMORE, D.M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, suppl.1, p.S11-S23, 2003.
- LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. The b-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v.14, p.413-420, 2006.
- LIVERMORE, D.M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p.3-10, 2008.
- LOLI, A.; TZOUVELEKIS, L.; TZELEPI, E.; CARATTOLI, A.; VATOPOULOS, A.C.; TASSIOS, P.T.; MIRIAGOU, V. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying bla_{vim-1}. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p. 669-672, 2006.

- LOPEZ-OTSOA, F.; GALLEGU, L.; TOWNER, K.J.; TYSALL, L.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 Carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a Hospital in Northern Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.12, p.4741–4743, 2002.
- LU, P.L.; DOUMITH, M.; LIVERMORE, D.M.; CHEN, T.L.; WOODFORD, N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, n.4, p.641-647, 2009.
- MAGNET S, COURVALIN P, *et al.* Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.45, p. 3375–3380. 2001.
- MAHILLON, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.725-774, 1998.
- MANIKAL, V.M.; LANDMAN, D.; SAURINA, G.; OYDNA, E.; LAL, H.; QUALE, J. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, p.101-106, 2000.
- MARCHAIM, D.; NAVON-VENEZIA, S.; SCHWARTZ, D.; TARABEIA, J.; FEFER, I.; SCHWABER, M.J.; CARMELI, Y. Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.5, p.1551-1555, 2007.
- MARQUE, S.; POIREL, L.; HÉRITIER, C.; BRISSE, S.; BLASCO, M.D.; FILIP, R.; COMAN, G.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Regional occurrence of plasmid mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter spp.* in Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.4885–4888, 2005.
- MARTÍ, S.; FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; PASCUAL, A.; RIBERA, A.; RODRIGUEZ-BANO, J.; BOU, G.; MIGUEL CISNEROS, J.; PACHON, J.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; VILA, J. Prevalence of the *tetA* and *tetB* genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.24, n.2, p.77–80, 2006.
- MARTINS, A.F.; KUCHENBECKER, R.; SUKIENNIK, T.; BOFF, R.; REITER, K.C.; LUTZ, L.; MACHADO A.B.; BARTH, A.L. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. **Infection**, v.37, n.5, p.474-476, 2009.
- MENDES, R.E.; TOLEMAN, M.A.; RIBEIRO, J.; SADER, H.S.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Integrin carrying a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP-16} and a Fused form of aminoglycosideresistant gene *aac*(6')-30/*aac*(6')-Ib': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.12, p.4693-702, 2004.
- MENDES, R.E.; KIYOTA, K.A.; MONTEIRO, J.; CASTANHEIRA, M.; ANDRADE, S.S.; GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.; TUFIK, S. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **J Clin Microbiol**, v.45, n.2, p.544-547, 2007.
- MENDES, C., OPLUSTIL, C., SAKAGAMI, E., TURNER, P., KIFFER, C. The MYSTIC Brazil Group Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC program Brazil 2002. **Braz J Infect Dis**, v.9, p.44–51, 2005.
- MERKIER, A.C.; CATALANO, M.; RAMÍREZ, M.S.; QUIROGA, C.; ORMAN, B.; RATIER, L. *et al.* Polyclonal spread of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. **J Infect Dev Ctries**, v.2, p.235-240, 2008.

- MOELLERING, R.C.; ELIOPOULOS, G.M.; SENTOCHNIK, D.E. The carbapenems: new broad spectrum β -lactam antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.24, p.1-7, 1989.
- MONTEIRO, J. **Caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *Klebsiella* spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea do projeto SCOPE Brasil**. São Paulo: UNIFESP, 2009. 129p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Infectologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.
- MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.1, p.4-333, 2009.
- MOSTACHIO, A.K.; VAN DER HEIDJEN, I.M.; ROSSI, F.; LEVIN, A.S.; COSTA, S.F. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding Oxa and metallo-beta-lactamases in carbapenem resistant *Acinetobacter* spp. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, pt.11, p.1522-1524, 2009.
- MOUBARECK, C.; BRÉMONT, S.; CONROY, M.C.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. GES-11, a novel integron-associated GES variante in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.8, p.3579-3581, 2009.
- MULIN, B.; TALON, D.; VIEL, J.F.; VINCENT, C.; LEPRAT, R.; THOUVEREZ, M.; MICHEL-BRIAND, Y. Risk factors for nosocomial colonization with multiresistant *Acinetobacter baumannii*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.14, n.7, p.569-576, 1995.
- MURPHY, T.A.; SIMM, A.M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.2, p.582-587, 2003.
- MURRAY, B.E.; MOELLERING, R.C. Evidence of plasmid-mediated production of aminoglycoside-modifying enzymes not previously described in *Acinetobacter*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.17, p.30-36, 1980.
- MURRAY, C.K.; HOSPENTHAL, D.R. *Acinetobacter* infection in the ICU. **Critical Care Clinics**, v.24, p.237-248, 2009.
- MUSHTAQ, S.; GE, Y.; LIVERMORE, D.M. Comparative activities of doripenem versus isolates, mutants, and transconjugants of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* spp. with characterized β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.1313-1319, 2004.
- NAAS, T.; NORDMANN, P. OXA-type β -lactamases. **Current Pharmaceutical Design**, v.5, p.865-879, 1999.
- NAAS, T.; BOGAERTS, P.; BAURAING, C.; DEGHELDRE, Y.; GLUPCZYNSKI, Y.; NORDMANN, P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum betalactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.178-182, 2006.
- NAIEMI, N.A.; DUIM, B.; SAVELKOUL, P.H.; SPANJAARD, E.; BART, A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; JONG, M.D. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.4862-4864, 2005.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Sequence Analysis. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Nucleotide Blast. Disponível em: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome. Acesso em: 10 jul. 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Working Group on Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 3.ed. Villanova: National Committee of Clinical Laboratory Standards, 1993. (NCCLS document, v.13, n.25) (NCCLS document, M7-A3).

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**: approved standard. 8.ed. Wayne: National Committee of Clinical Laboratory Standards, 2003. 26p. (NCCLS document, M2-A8).

NAVON-VENEZIA, S.; LEAVITT, A.; CARMELI, Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.772–774, 2007.

NEMEC, A.; MUSILEK, M.; MAIXNEROVÁ, M.; DE BAERE, T.; VAN DER REIJDEN, T.J.; VANECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L. *Acinetobacter beijerinckii* sp. Nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. Nov., haemolytic organisms isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, pt.1, p.118-124, 2009.

NEVERS, P.; SADLER, H. Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements. **Nature**, v.268, p.109-115, 1977.

NICOLAU, D.P.; Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of meropenem. **Clin Infect Dis**, v.47 Suppl 1, p. 32-40, 2008.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, p.593–656, 2003.

NIUMSUP, P.R.; BOONKERD, N.; TANSAWAI, U.; TILOKLURS, M. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. **Jpn J Infect Dis**, v.62, n.2, p.152-154, 2009.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, p.321-331, 2002.

OBARA, M.; NAKAE, T. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.28, p.791–800, 1991.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, M.S.; PRADO, G.V.; COSTA, S.F.; GRINBAUM, R.S.; LEVIN, A.S. Ampicillin/sulbactam compared with polymyxins for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, n.6, p.1369-1375, 2008.

OLIVER, A. Resistencia a carbapenemas y *Acinetobacter baumannii*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.22, n.5, p.259-261, 2004.

OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; WACHAROTAYANKUM, R.; OHTAA, M.; HORII, T.; ITO, H.; YOSHIMURA, F.; KATO, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo-beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that show imipenem resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, p.71-78, 1994.

PAGÈS, J.M.; JAMES, C.E.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, n.12, p.893-903, 2008.

- PALMEN, R.; HELLINGWERF, K.J. Uptake and processing of DNA by *Acinetobacter calcoaceticus*: a review. **Gene**, v.192, p.179–190, 1997.
- PARTRIDGE, S.R.; BROWN, H.J.; HALL, R.M. Characterization and movement of the class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.5, p.1288–1294, 2002.
- PATON, R.; MILES, R.S.; HOOD, J *et al.* ARI-1: b-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents**, v.2, n.2, p.81–87, 1993.
- PATZER, J.; TOLEMAN, M.A.; DESHPANDE, L.M.; KAMINSKA, W.; DZIERZANOWSKA, D.; BENNETT, P.M.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual blaVIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998–2001). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n.3, p.451–456, 2004.
- PAVEZ, M.; NEVES, P.; DROPA, M.; MATTÉ, M.H.; GRINBAUM, R.S.; DE ARAÚJO, M.R.; MAMIZUKA E.M.; LINCOPAN, N. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC {beta}-lactamase in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, pt.12, p.1590–1592, 2008.
- PAVEZ, M.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M. Produção de Carbapenemases em Enterobactérias isoladas em hospitais de São Paulo: emergência da variante KPC-2 no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, supl.1, p.90, res.FCF175, 2008. [Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 12, Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 43, Seminário de Pós-Graduação, 23, Reunião de Iniciação Científica, 16, São Paulo, 2008].
- PELEG, A.Y.; FRANKLIN, C.; WALTERS, L.J.; BELL, J.M.; SPELMAN, D.W. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter spp.* collected over 10 years in three continents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.1, p.399–400, 2006.
- PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.21, n.3, p.538–582, 2008.
- POIREL, L.; NAAS, T.; NICOLAS, D.; COLLET, L.; BELLAIS, S.; CAVALLO, J.D.; 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.4, p.891–897, 2000.
- POIREL, L.; LAMBERT T.; TURKOGLU, S.; RONCO, E.; GAILLARD, J.L.; NORDMANN, P.; Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the blaVIM-2 carbapenem-hydrolyzing β -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 2, p. 546–52, 2001.
- POIREL, L.; DECOUSSER, J.W.; NORDMANN, P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla_{CTX-M} β -lactamase gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.2938–2945, 2003.
- POIREL L.; MAGALHAES, M.; LOPES, M.; NORDMANN, P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene blaSPM-1 surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.4, p.1406–1409, 2004.
- POIREL, L.; CABANNE, L.; VAHABOGLU, H.; NORDMANN, P. Genetic environment and expression of the extended-spectrum β -lactamase bla- PER-1 gene in gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.1708–1713, 2005a.

- POIREL, L.; MARQUE, S.; HÉRITIER, C.; SEGONDS, C.; CHABANON, G.; NORDMANN, P. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.202-208, 2005b.
- POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12 n.9, p.826–836, 2006a.
- POIREL, L.; NORDMANN, P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.1442–1448, 2006b.
- POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**.v.54, p.24-38, 2010.
- POOLE, K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.3, p.77–98, 2002.
- POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.20–51, 2005.
- PUJANA, I.; GALLEGU, L.; MARTIN, G.; LOPEZ, F.; CANDUELA, J.; CISTERNA, R. Epidemiological analysis of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic Bronchiectasis patients without cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.2071-2073, 1999.
- QI, C.; MALCZYNSKI, M.; PARKER, M.; SCHEETZ, M.H. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.3, p.1106-1109, 2008.
- QUALE, J.; BRATU, S.; LANDMAN, D.; HEDDURSHETTI, R. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, p.214–220, 2003.
- QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.3, p.440-458, 2007.
- RECCHIA, G.D.; HALL, R.M. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. **Trends in Microbiology**, v.5, n.10, p.389-394, 1997.
- RENDERS, N.; RÖMLING, U.; VERBRUGH, H.; VAN BELKUN, A. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Random Amplification of Polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.12, p.3190-3195, 1996.
- RODLOFF, A.C.; GOLDSTEIN, E.J.; TORRES, A. Two decades of imipenem therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.916-929, 2006.
- ROSENTHAL S, TAGER IB. Prevalence of gram-negative rods in the normal pharyngeal flora. **Annals of Internal Medicine**, v.83, p.355–357, 1975.
- SAALFELD, S.M.; VIANA, G.; SIQUEIRA, V.L.; CARDOSO, C.L.; GARCIA, L.; TOGNIM, M.C. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v.72, n.4, p.365-368, 2009.

- SABATÉ, M.; NAVARRO, F.; MIRÓ, E.; CAMPOY, S.; MIRELIS, B.; BARBÉ, L.; PRATS, G. Novel complex *sul1*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.2656–2661, 2002.
- SACHA, P.; WIECZOREC, P.; HAUSCHILD, T.; ZÓRAWSKI, M.; OLSZANSKA, D.; TRYNISZEWSKA, E. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*: a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.46, n.2, p.137-142, 2008.
- SADER, H.S.; CASTANHEIRA, M.; MENDES R.E.; TOLEMAN, M.; WALSH, T.R.; JONES, R.N. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.1, p.57-61, 2005a.
- SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBERT, S.; GALES, A.C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, n.1, p.73-76, 2005b.
- SAMBROOK, J.; RUSEL, D.W. Agarose gel electrophoresis. In: SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. cap.7, 7.9-7.12 e 1.43-7.45
- SCAIFE, W.; YOUNG, H.K.; PATON, R.H.; AMYES, S.G. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.36, p.585–586, 1995.
- SCERPELLA, E.G.; WANGER, A.R.; ARMITTAGE, L.; ERICSSON, C.D. Nosocomial outbreak caused by multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii*: results of the case-control and molecular epidemiologic investigations. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.16, p.92-97, 1995.
- SCHIMITH BIER, K.E.; LUIZ, S.O.; SCHEFFER, M.C.; GALES, A.C.; PAGANINI, M.C.; NASCIMENTO, A.J.; CARIGNANO, E.; DALLA COSTA, L.M. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. **Am J Infect Control**; v.38, n.4, p.308–314, 2010.
- SEGAL, H.; THOMAS, R.; ELISHA, B.G. Characterization of class 1 integron resistance gene cassettes and the identification of a novel IS-like element in *Acinetobacter baumannii*. **Plasmid**, v.49, p.169–178, 2003.
- SEGAL, H.; NELSON, E.C.; ELISHA, B.G. Genetic environment of *ampC* in *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.612–614, 2004.
- SEGAL, H.; ELISHA, B.G. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.598, 2005.
- SEGAL, H.; GARNY, S.; ELISHA, B.G. Is IS_{Aba-1} customized for *Acinetobacter*? **FEMS Microbiology Letters**, v.243, p.425–429, 2005.
- SEVERINO, P.; MAGALHAES, V.D. Integrons as tools for epidemiological studies. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n.2, p.156–162, 2004.
- SHELBURNE, S.A.; SINGH, K.V.; WHITE, A.C.; BYRNE, L.; CARMER, A.; AUSTIN, C.; GRAVISS, E.; STAGER, C.; MURRAY, B.E.; ATMAR, R.L. Sequential outbreaks of infections by distinct *Acinetobacter baumannii* strains in a public teaching hospital in Houston, Texas. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.198–205, 2008.

- SIEGMAN-IGRA, Y.; BAR-YOSEF, S.; GOREA, A.; AVRAM, J. Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. **Clinical Infectious Diseases**, v.17, 843–849, 1993.
- SILBERT, S.; PFALLER, M.A.; HOLLIS, R.J.; BARTH, A.L.; SADER, H.S. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative gram-negative bacilli. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.25, n.10, p.847-851, 2004.
- SIROY, A.; MOLLE, V.; LEMAÎTRE-GUILLIER, C.; VALLENET, D.; PESTEL-CARON, M.; COZZONE, A.J.; JOUENNE, T.; DE, E. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.12, p.4876–4883, 2005.
- SMOLYAKOV, R.; BORER, A.; RIESENBERG, K.; SCHLAEFFER, F.; ALKAN, M.; PORATH, A.; RIMAR, D.; ALMOG, Y.; GILAD, J. Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin–sulbactam treatment. **Journal of Hospital Infection**, v.54, n.1, p.32–38, 2003.
- SNAVELY, S.R.; HODGES, G.R. The neurotoxicity of antibacterial agents. **Annals of Internal Medicine**, v.101, p.92–104, 1984.
- STOKES, H.W.; HALL, R.M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology**, v.3, n.12, p.1669-1683, 1989.
- SU, X.Z.; CHEN, J.; MIZUSHIMA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. AbeM, an H₂ coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.4362–4364, 2005.
- SYRMIS, M.W.; O'CARROLL, M.R.; SLOOTS, T.P.; COULTER, C.; WAINWRIGHT, C.E.; BELL, S.C.; NISSEN, M.D. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.1089-1096, 2004.
- TIMSIT, J.F.; GARRAIT, V.; MISSET, B.; GOLDSTEIN, F.W.; RENAUD, B.; CARLET, J. The digestive tract is a major site for *Acinetobacter baumannii* colonization in intensive care unit patients. **Journal of Infectious Diseases**, v.168, p.1336-1337, 1993.
- TJERNBERG, I.; URSING, J. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* strains identified by DNA-DNA hybridization. **APMIS**, v.98, p.320-326, 1989.
- TOGNIM, M. C. B.; ANDRADE, S.S.; SILBERT, S.; GALES, A.C.; JONES, R.N.; SADER, S. Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 8, p.284-291, 2004.
- TOGNIM, M.C.; GALES, A.C.; PENTEADO, A.P.; SILBERT, S.; SADER, H.S. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.27, p.742-747, 2006.
- TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A.; GALES, A.C.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, n.5, p.673-679, 2002.

- TOLEMAN, M.A.; BIEDENBACH, D.; BENNETT, D.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Genetic characterization of a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*IMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, n.4, p.583-590, 2003.
- TOMAS, M.D.M.; BECEIRO, A.; PEREZ, A.; VELASCO, D.; MOURE, R.; VILLANUEVA, R.; MARTINEZ-BELTRAN, J.; BOU, G. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.12, p.5172-5175, 2005.
- TOWNER, K.J. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. **Journal of Medical Microbiology**, v.46, n.2, p.721-746, 1997.
- TURTON, J.F.; KAUFMANN, M.E.; GLOVER, J.; COELHO, J.M.; WARNER, M.; PIKE, R.; PITT, T.L. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.3074-3082, 2005.
- TURTON, J.F.; WARD, M.E.; WOODFORD, N.; KAUFMANN, M.E.; PIKE, R.; LIVERMORE, D.M.; PITT, T.L. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiology Letters**, v.258, n.1, p.72-77, 2006.
- TURTON, J.F.; KAUFMANN, M.E.; GILL, M.J.; PIKE, R.; SCOTT, P.T.; FISHBAIN, J.; CRAFT, D.; DEYE, G.; RIDDELL, S.; LINDLER, L.E.; PITT, T.L. Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.7, p.2630-2634, 2006.
- VAN DEN BROEK, P.J.; ARENDS, J.; BERNARDS, A.T.; DE BRAUWER, E.; MASCINI, E.M.; VAN DER REIJDEN, T.J.K.; SPANJAARD, L.; THEWESSEN, E.A.P.M.; VAN DER ZEE, A.; VAN ZEIJL, J.H.; DIJKSHOORN, L. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in the Netherlands during the period 1999-2001. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n.9, 837-843, 2006.
- VILA, J.; MARCO, F. Interpretative reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.20, p.304-312, 2002.
- VILLEGAS, M.V.; HARTSTEIN, A.I. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.24, p.284-295, 2003.
- VILLERS, D.; ESPAZE, E.; COSTE-BUREL, M.; GIAUFFRET, F.; NININ, E.; NICOLAS, F.; RICHET, H. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. **Annals of Internal Medicine**, v.129, n.3, p.182-189, 1998.
- VON DOLINGER DE BRITO, D.; OLIVEIRA, E.J.; ABDALLAH, V.O., DA COSTA DARINI, A.L., FILHO, P.P. An outbreak of *Acinetobacter baumannii* septicemia in a neonatal intensive care unit of a university hospital in Brazil. *Braz J Infect Dis.*; v.9, n.4, p.301-9, 2005.
- VON GRAEVENITZ, A. *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative bacteria. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H., eds. **Manual of clinical microbiology**. 6.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995. p.520-532.
- WALSH, T.R.; BOLMSTROM, A.; QWARNSTROM, A.; GALES, A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.2755-2759, 2002.

- WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; HRYNIEWICZ, W.; BENNETT, P.M.; JONES, R.N. Evolution of an integron carrying *bla*VIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, n.1, p.116-119, 2003.
- WALSH, T.R. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, suppl.6, p.2-9, 2005.
- WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p.306-325, 2005.
- WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.373-383, 2006.
- WANG, H.; GUO, P.; SUN, H.; WANG, H.; YANG, Q.; CHEN, M.; XU, Y.; ZHU, Y. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.11, p.4022-4028, 2007.
- WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. Febre: mitos que determinam condutas. **Uso Racional de Medicamentos: Temas Selecionados**, v.1, n.9, p.1-6, 2004.
- WILSON, S.J.; KNIPE, C.J.; ZIEGER, M.J.; GABEHART, K.M.; GOODMAN, J.E.; VOLK, H.M.; SOOD, R. Direct costs of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the burn unit of a public teaching hospital. **American Journal of Infection Control**, v.32, p.342-344, 2004.
- WINN, W.C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p.353-355.
- WISE, K.A.; TOSOLINI, F.A. Epidemiological surveillance of *Acinetobacter* species. **Journal of Hospital Infection**, v.16, p.319-329, 1990.
- WISPLINGHOFF, H.; PERBIX, W.; SEIFERT, H. Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. **Clinical Infectious Diseases**, v.28, 59-66, 1999.
- WISPLINGHOFF, H.; SCHMITT, R.; WOHRMANN, A.; STEFANIK, D.; SEIFERT, H. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Hospital Infection**, v.66, p.174-181, 2007.
- WOOD, G.C.; HANES, S.D.; CROCE, M.A.; FABIAN, T.C.; BOUCHER, B.A. Comparison os ampicillin-sulbactam and imipenem-cilastatin for the tratament of *Acinetobacter* ventilator-associated pneumonia. **Clinical Infectious Diseases**, v.34, n.11, p.1425-1430, 2002.
- WOOD, G.C.; HANES, S.D.; BOUCHER, B.A.; CROCE, M.A.; FABIAN, T.C. Tetracyclines for treating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. **Intensive Care Medicine**, v.29, p.2072-2076, 2003.
- WOODFORD, N.; ELLINGTON, M.J.; COELHO, J.M.; TURTON, J.F.; WARD, M.E.; BROWN, S.; AMYES, S.G.B.; LIVERMORE, D.M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.27, n.4, p.351-353, 2006.
- YAN, J.J.; TSAI, S.H.; CHUANG, C.L.; WU, J.J. Oxa-type beta lactamases among extended-spectrum cephalosporin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a university hospital in southern Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.39, p.130-134, 2006.

YOUNG, D.; BELL, J.M.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R. A novel sub-group methalo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Austrália. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, abstr.C1-593, p.75, 2007.

ZARRILLI, R.; CRISPINO, M.; BAGATTINI, M.; BARRETTA, E.; DI POPOLO, A.; TRIASSI, M.; VILLARI, P. Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3, p.946-953, 2004.

ZHANEL, G.G.; WIEBE, R.; DILAY, L.; THOMSON, K.; RUBINSTEIN, E.; HOBAN, D.J.; NOREDDIN, A.M.; KARLOWSKY, J.A. A review of the carbapenems. **Drugs**, v.67, n.7, p.1027–1052, 2007.

ZHOU, H.; YANG, Q.; YU, Y.S.; WEI, Z.-Q.; LI, L.J. Clonal spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* among different cities of China. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.12, p.4054-4057, 2007.

APÊNDICES

Apêndice 1.	An outbreak of multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> : characterization of bla _{oxa} -like genes. Resumo apresentado no 1º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica em Gramado (2008).....	91
Apêndice 2.	Surto fatal por <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente: caracterização molecular de genes bla _{oxa} e seu entorno genético. Resumo apresentado no Congresso Brasileiro de Controle de Infecção Hospitalar e Epidemiologia Hospitalar no Rio de Janeiro (2008).....	92
Apêndice 3.	Disseminação e emergência de genes bla _{OXA-23} , bla _{OXA-58} , bla _{OXA-72} e sequências de inserção (IS) em isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos, São Paulo. Resumo apresentado no 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia em Porto de Galinhas (2009).....	93
Apêndice 4.	Carta submetida para publicação no International Journal of Antimicrobial Agents (2010).....	94

ANEXO

Anexo 1.	Ficha de aluno.....	102
-----------------	---------------------	-----

1º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. Gramado, 2008.

ResumoID:400

AN OUTBREAK OF MULTIDRUG-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII*: CHARACTERIZATION OF BLA_{OXA}-LIKE GENES

Charline Santos¹, Francielle Fortunato¹, Larissa B. Terasawa², Carmem S. Ito²,
Maria da Rocha Gaspar², Lorena C. W. de Brito², Cesar R. Busato², Elsa M.
Mamizuka¹ and Nilton Lincopan¹

¹ Lab. Microbiologia Clínica, FCF-USP, São Paulo; ² Santa Casa de
Misericórdia de Ponta Grossa, Paraná.

Introduction: *Acinetobacter baumannii* display mechanisms of resistance to all existing antibiotic classes as well as a prodigious capacity to acquire new determinants of resistance. Currently, the emergence of oxacillinases in *A. baumannii* has become of global concern; however, in Brazil this phenomenon has been little studied.

Objectives: To investigate an outbreak of multidrug-resistant *A. baumannii* and to characterize the mechanisms of resistance involved.

Material and Methods: The investigation included 17 patients infected with MDR *A. baumannii*. For all isolates, MICs values were determined by the agar dilution method and E-test. Beta-lactamase genes and insertion sequences were screened by PCR. Clonality analysis was performed by ERIC-PCR and the similarity level was calculated using the Dice coefficient.

Results and Conclusion: During the outbreak 9/17 (53%) patients died. All isolates were resistant to ciprofloxacin, amikacin, ceftazidime and cefepime; 35% was resistant to imipenem (IMP) and meropenem, and 10% was resistant to polymyxin B. Tobramycin and ampicillin/sulbactam showed higher *in vitro* activity against MDR *A. baumannii*. In fact, five patients were successfully treated with ampicillin/sulbactam. Three clones were characterized. The ERIC-II clone was predominant (88.2%) and probably endemic in the hospital, since strains of *A. baumannii* isolated before the outbreak, exhibited an identical ERIC-II profile. Curiously, 12 isolates clustered in group ERIC-II were sensible to IMP (MIC ≤ 2 µg/ml), whereas another five ERIC-II isolates were resistant to IMP (MIC ≥ 16 µg/ml) due to the production of OXA-23-type carbapenemase. Most likely, imipenem-resistant isolates had acquired the bla_{OXA-23} gene via a mobile element. In fact, ISAb₁ was found upstream of bla_{OXA-23}. Finally, all isolates harbored the bla_{OXA-51} gene. Early recognition of these phenotypes will aid in the control of dissemination and in the drawing up of effective therapeutic and epidemiological measures.

SURTO FATAL POR ACINETOBACTER BAUMANNII MULTIRRESISTENTE: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES *BLA_{OXA}* E SEU ENTORNO GENÉTICO

Charline Santos¹, Mariama Tomaz¹, Francielle Fortunato¹, Larissa B. Terasawa², Carmem S. Ito², Maria D. da Rocha Gaspar², Lorena C. W. de Brito², Cesar R. Busato², Nilton Lincopan¹, Elsa M. Mamizuka¹

¹ Depto. Análises Clínicas, Lab. Microbiologia Clínica, FCF-USP, São Paulo; ² Santa Casa de Misericórdia de Ponta Grossa-PR.

Introdução e Objetivos: A expressão de genes responsáveis pela produção de enzimas carbapenemases do tipo serina (oxacilinas) tem sido relatada mundialmente em *A. baumannii*, porém no Brasil este fenômeno tem sido pouco estudado. No presente trabalho foi caracterizada a disseminação clonal de cepas de *A. baumannii*, seu mecanismo de resistência e mobilização genética, durante um surto fatal num centro hospitalar público.

Material e Métodos: De maio/07 a janeiro/08, 17 cepas de *A. baumannii* foram coletadas. O perfil de sensibilidade antibacteriana foi avaliado pelo método de difusão em disco com posterior determinação da CIM por E-test e método de diluição em ágar na presença e ausência de inibidores específicos de beta-lactamases. A presença de genes de resistência associados à produção de enzimas do tipo OXA (*bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}*) e MBL (*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*) foi investigada através da técnica de PCR. A mobilização genética dos genes *bla_{OXA}* foi direcionada à pesquisa de seqüências de inserção do tipo *IS_{SabA}*. Finalmente, o estudo da clonalidade foi realizado por ERIC-PCR com posterior análise de *clusters* pelo coeficiente de Dice.

Resultados e Conclusão: Durante o surto 9/17 (53%) pacientes foram à óbito. Todas as cepas apresentaram 100% de resistência à ciprofloxacina, amicacina, ceftazidima e cefepime; 35% foi resistente ao imipenem e ao meropenem e 10% a polimixina B. Os antibióticos com maior atividade *in vitro* foram a tobramicina (100% de sensibilidade) e ampicilina/sulbactam (88% de sensibilidade). Foram caracterizados 3 clones diferentes. O clone identificado como ERIC-II foi predominante (88,2%) e possivelmente já era endêmico no hospital, uma vez que cepas controle isoladas anteriormente ao surto, apresentaram um idêntico perfil ERIC-II. Surpreendentemente, durante o surto, 12 cepas ERIC-II foram sensíveis ao IMP (CIM ≤ 2 µg/ml) enquanto que 5 cepas ERIC-II foram resistentes (CIM ≥ 16 µg/ml) devido à produção da oxacilinase OXA-23. Aparentemente, as cepas ERIC-II *bla_{OXA-23}* positivo adquiriram este determinante genético de resistência após o aparecimento de uma única cepa clonalmente diferente (denominada ERIC-III) a qual carregava o gene *bla_{OXA-23}*. A mobilização de *bla_{OXA-23}* foi associada à seqüência de inserção *IS_{SabA}* a qual foi identificada na região *upstream* do gene. Adicionalmente, a presença do gene *bla_{OXA-51}* foi identificada em todas as cepas de *A. baumannii*, confirmando a origem intrínseca do gene mundialmente reportado nesta espécie. Dos 8 pacientes com prognóstico favorável, 5 (63%) fizeram uso de ampicilina/sulbactam. O aparecimento deste novo evento genético em *A. baumannii* no Brasil, deve alertar a comunidade médica no controle da disseminação e no aparecimento de novos surtos.

Apêndice 3. Disseminação e emergência de genes Bla_{OXA-23} , Bla_{OXA-58} , Bla_{OXA-72} , e sequências de inserção (IS) em isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, São Paulo

25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Porto de Galinhas, 2009 ResumoID:1508-1

DISSEMINAÇÃO E EMERGÊNCIA DE GENES BLA_{OXA-23} , BLA_{OXA-58} , BLA_{OXA-72} , E SEQUÊNCIAS DE INSERÇÃO (IS) EM ISOLADOS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS, SÃO PAULO

Charline Santos (FCF/USP); **Patrícia R. Neves** (FCF/USP); **Elsa M. Mamizuka** (FCF/USP); **Nilton Lincopan** (ICB/USP)

Resumo

Genes responsáveis pela produção de enzimas carbapenemases do tipo OXA têm sido mundialmente relatados em isolados de *Acinetobacter spp.* No Brasil este evento genético tem sido pouco estudado. O objetivo deste estudo foi identificar a presença de genes bla_{OXA} e seu entorno genético em isolados clínicos de *A. baumannii* isolados de hospitais de São Paulo e Ponta Grossa (PR). Entre 2004 – 2008, foram recuperados 36 isolados multirresistentes de *A. baumannii* entre pacientes hospitalizados em 7 hospitais de São Paulo e 1 de Ponta Grossa. O perfil de sensibilidade antibacteriana foi avaliado pelo método de difusão em disco com posterior determinação da CIM por E-test e método de diluição em ágar na presença e ausência de inibidores específicos de β -lactamases. A presença de genes de resistência associados à produção de enzimas do tipo OXA (bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{OXA-51} , bla_{OXA-58}) e metalo- β -lactamase (bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{SPM}) foi investigada através da técnica de PCR e sequenciamento. A mobilização genética dos genes bla_{OXA} foi direcionada à pesquisa de sequências de inserção do tipo IS*Aba1* e IS*Aba3*. Finalmente, o estudo da clonalidade foi realizado por ERIC-PCR com posterior análise de *clusters* pelo coeficiente de Dice. Todos os isolados foram resistentes ao imipenem (CIM ≥ 16), meropenem, ciprofloxacina e ceftazidima; 97% foram resistentes à ceftazidima, e 69% a cefepime. Os antibióticos com maior atividade *in vitro* foram a ampicilina/sulbactam e tobramicina (61% de sensibilidade). Em 42% dos isolados foi identificado o gene bla_{OXA-23} associado à sequência de inserção IS*Aba1* na região *upstream* do gene (GenBank accession FJ628170). Apenas uma cepa foi bla_{OXA-58} positiva (GenBank accession FJ492877) e a presença da sequência de inserção IS*Aba3* foi identificada na região *upstream* e *downstream* do gene. Surpreendentemente a variante bla_{OXA-72} (GenBank accession FJ969387) foi encontrada em 5,5% dos isolados. Em todos os isolados foi confirmada a origem intrínseca do gene bla_{OXA-51} , enquanto genes responsáveis pela produção de MBL não foram identificados. Entre os 36 isolados carbapenem resistentes foram identificados 12 clones, confirmando-se a disseminação clonal de cepas bla_{OXA-23} positivas. A emergência de novas variantes bla_{OXA} codificando carbapenemases em *A. baumannii* no Brasil, deve alertar a comunidade médica sobre o potencial de disseminação como já ocorre com OXA-23.

1 Letters to the Editor (MS # AAC01102-10 - Version 2 - Revised)

2 High Prevalence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Carrying
3 the *bla*_{OXA-143} Gene in Brazilian Hospitals
4

5 A recent article by Higgins et al. reported the identification of a novel
6 carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDL), defined as OXA-143, in a
7 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Brazil in 2004 (5).
8 This enzyme, which has 88% identity with OXA-40, is the first representative of a
9 novel subgroup of CHDLs, whose prevalence remains to be determined (5). In an
10 attempt to carry on such a task, we have conducted a surveillance study of
11 carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates in order to determine the antimicrobial
12 susceptibility patterns and prevalence of *bla*_{OXA}-type carbapenemase genes in medical
13 centers in both the southeastern and southern regions of Brazil. We hereby report a
14 high prevalence of carbapenem-resistant *A. baumannii* carrying the *bla*_{OXA-143} and
15 *bla*_{OXA-23} genes, along with the results of the first isolations of strains carrying *bla*_{OXA}-
16 72 (OXA-72 is a single amino acid variant of OXA-40) and *bla*_{OXA-58} genes in
17 Brazilian hospitals.

18 From 2004 to 2008, thirty-six carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates,
19 recovered from different patients hospitalized in eight medical centers, were screened
20 for the presence of genes encoding metallo- β -lactamases (M β Ls) and OXA-type β -
21 lactamases (6, 15). Flanking sequences of *bla*_{OXA}-type genes were characterized by
22 PCR, using primers targeting IS*Aba*-1 or -3 (12). PCR products were confirmed by
23 sequencing and genetic diversity of *bla*_{OXA}-positive strains was determined by
24 analysis of ERIC-PCR (11).

25 All isolates were found to be resistant to imipenem, meropenem, ceftazidime,
26 aztreonam, piperacillin/tazobactam and ciprofloxacin. Susceptibility rates were
27 observed for tobramycin (61.1%), ampicillin/sulbactam (61.1%), gentamicin (47.2%),
28 amikacin (27.8%) and cefepime (11.1%). M β L-encoding genes were not identified,
29 whereas a high prevalence of *bla*_{OXA} genes was noticed among carbapenem-resistant
30 isolates (Table 1). In this regard, twenty-one strains (58.3%) carried the *bla*_{OXA-143}
31 gene; fifteen strains (41.7%) carried the *ISAb*_a-1/*bla*_{OXA-23} gene array; one strain
32 carried the *ISAb*_a-3/*bla*_{OXA-58}/*ISAb*_a-3 gene array; and two isolates carried the *bla*_{OXA-}
33 ₇₂ gene (Genbank accession nos. FJ628170, FJ492877, FJ969387, and HM804278 –
34 HM804281). Although the presence of *bla*_{OXA-51} and *ISAb*_a-1 genes was confirmed in
35 all isolates, no co-linearity (i.e., *ISAb*_a-1 adjacent to the *bla*_{OXA-23} gene) was observed
36 between both genes. Isolates harboring *bla*_{OXA-143}, *bla*_{OXA-72} and *bla*_{OXA-58} genes were
37 restricted to hospitals located in São Paulo (the largest and most populous
38 metropolitan area in southeastern Brazil), while *bla*_{OXA-23}-harboring *A. baumannii*
39 isolates were obtained from hospitals in São Paulo and Paraná (in southern Brazil),
40 confirming previous reports of widespread dissemination of OXA-23-producing *A.*
41 *baumannii* in this region (1, 9). Finally, ERIC-PCR typing revealed genetic diversity
42 among *bla*_{OXA-143}- and *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* isolates.

43 In summary, the *bla*_{OXA-143} gene was commonly identified among carbapenem-
44 resistant *A. baumannii* isolates surveyed in this study. Besides, we report the first
45 isolation of *bla*_{OXA-72}- and *bla*_{OXA-58}-carrying strains in Brazilian hospitals. OXA-143
46 is a new subgroup of CHDL so far identified in isolates of *A. baumannii* from Brazil
47 (5). We would only bring to mind that the *bla*_{OXA-72} gene was first reported from an *A.*
48 *baumannii* strain in Thailand in 2004 (GenBank accession no. AY739646), and so far

49 it has been restricted to *Acinetobacter* spp. isolates from Asian and Mediterranean
50 countries (2, 4, 7, 8, 14).

51

52 ACKNOWLEDGMENTS

53 FAPESP and CNPq research grants are gratefully acknowledged. We would like to
54 thank Cefar Diagnóstica Ltda. (São Paulo, Brazil) for kindly supplying antibiotic
55 discs for susceptibility testing, and Drs M. Miranda, L. B. Teresawa, C. S. Ito, M.
56 Gaspar, C. R. Busato and M. C. Noronha do Amaral for providing clinical isolates.

57

58 REFERENCES

- 59 [1] Carvalho, K.R., A.P. Carvalho-Assef, G. Peirano, L.C. Santos, M.J. Pereira,
60 and M.D. Asensi. 2009. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter*
61 *baumannii* genotypes carrying *bla_{OXA-23}* collected from hospitals in Rio de Janeiro,
62 Brazil. Int. J. Antimicrob. Agents. 34:25-28.
- 63 [2] Candel, F.J., N. Calvo, J. Head, A. Sánchez, M. Matesanz, E. Culebras, A.
64 Barrientos, and J. Picazo. 2010. A combination of tigecycline, colistin, and
65 meropenem against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in a
66 renal transplant recipient: pharmacodynamic and microbiological aspects. Rev.
67 Esp. Quimioter. 23:103-108.
- 68 [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for
69 antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. M100-S19.
70 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 71 [4] Di Popolo, A., M. Giannouli, M. Triassi, S. Brisse, and R. Zarrilli. 28 April
72 2010. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant
73 *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a

- 74 multilocus sequence typing scheme. Clin. Microbiol. Infect. doi:10.1111/j.1469-
75 0691.2010.03254.x.
- 76 [5] Higgins, P.G., L. Poirel, M. Lehmann, P. Nordmann, and H. Seifert. 2009.
77 OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in
78 *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents. Chemother. 53:5035-5038.
- 79 [6] Higgins, P.G., M. Lehmann, and H. Seifert. 2010. Inclusion of OXA-143
80 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding
81 prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int. J. Antimicrob. Agents.
82 35:305.
- 83 [7] Lee, K., M.N. Kim, T.Y. Choi, S.E. Cho, S. Lee, D.H. Whang, D. Yong, Y.
84 Chong, N. Woodford, D.M. Livermore, and KONSAR Group. 2009. Wide
85 dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates
86 from South Korea. Int. J. Antimicrob. Agents. 33:520-524.
- 87 [8] Lu, P.L., M. Doumith, D.M. Livermore, T.L. Chen, and N. Woodford. 2009.
88 Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from
89 a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. J.
90 Antimicrob. Chemother. 63:641-647.
- 91 [9] Schimith Bier, K.E., S.O. Luiz, M.C. Scheffer, A.C. Gales, M.C. Paganini,
92 A.J. do Nascimento, E. Carignano, and L.M. Dalla Costa. 2010. Temporal
93 evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern
94 Brazil. Am. J. Infect. 38:308-314.
- 95 [10] Schreckenberger, P.C., M.I. Daneshvar, R.S. Weyant, and D.G. Hollis.
96 2003. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella* and other
97 nonfermentative gram-negative rods, p. 749-779. In P.R. Murray, E.J. Baron, J.H.

- 98 Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenenbaum (ed.), Manual of clinical
99 microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
- 100 [11] Silbert, S., M.A. Pfaller, R.J. Hollis, A.L. Barth, and H.S. Sader. 2004.
101 Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-
102 negative bacilli. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 25:847-851.
- 103 [12] Turton, J.F., M.E. Ward, N. Woodford, M.E. Kaufmann, R. Pike, D.M.
104 Livermore, T.L. Pitt. 2006. The role of IS_{Aba1} in expression of OXA
105 carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol. Lett.
106 258:72-77.
- 107 [13] Turton, J.F., N. Woodford, J. Glover, S. Yarde, M.E. Kaufmann, and T.L.
108 Pitt. 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla_{OXA}-
109 51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. J. Clin. Microbiol. 44:2974-
110 2976.
- 111 [14] Wang, H., P. Guo, H. Sun, H. Wang, Q. Yang, M. Chen, Y. Xu, and Y.
112 Zhu. 2007. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant
113 *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. Antimicrob. Agents Chemother.
114 51:4022-4028.
- 115 [15] Woodford, N. 2010. Rapid characterization of beta-lactamases by multiplex
116 PCR. Methods Mol. Biol. 642:181-192.
- 117
118
119
120
121
122

123 **Charline S. Antonio**
124 **Patrícia R. Neves**
125 **Micheli Medeiros**
126 **Elsa M. Mamizuka**
127 *Department of Clinical Analysis,*
128 *School of Pharmacy,*
129 *Universidade de São Paulo,*
130 *São Paulo, Brazil*
131
132 **Maria R. Elmor de Araújo**
133 *Laboratory of Clinical Microbiology,*
134 *Hospital Beneficência Portuguesa,*
135 *São Paulo, Brazil*
136
137 **Nilton Lincopan***
138 *Department of Microbiology,*
139 *Institute of Biomedical Sciences &*
140 *Department of Clinical Analysis,*
141 *School of Pharmacy,*
142 *Universidade de São Paulo*
143 *CEP 05508-000, São Paulo, Brazil*
144
145 *Phone: 55 (11) 3091 7296
146 Fax: 55 (11) 3091 7354
147 E-mail: lincopan@usp.br

148 Tables

149 Table 1. Characteristics of carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates carrying
 150 *bla*_{OXA}-type genes encoding class D carbapenemases^a

151 ^a All multidrug-resistant *A. baumannii* were included in this study. Multidrug
 152 resistance was defined as resistance to three or more representatives of the major
 153 antibiotic categories (i.e., quinolones, extended-spectrum cephalosporins,
 154 aminoglycosides, and carbapenems). The *A. baumannii* isolates were identified by
 155 using the Vitek 2® automated instrument ID system, conventional biochemical tests,
 156 and by detection of the *bla*_{OXA-51}-like gene (10, 13). Susceptibilities to all
 157 antimicrobial agents were determined by disk diffusion, agar dilution, and the E-test
 158 (Ab Biodisk, Solna, Sweden), and interpreted according to criteria of the Clinical and
 159 Laboratory Standards Institute (3). ERIC-PCR fingerprint patterns were analyzed
 160 using Dice similarity coefficient and UPGMA cluster method (BioNumeric software,
 161 Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

162 ^b SP, São Paulo state (southeastern Brazil); PR, Paraná state (southern Brazil).

163 ^c IPM, imipenem.

164 ^d Flanked by IS*Aba*-3 (downstream) and an IS*Aba*-3-like element (upstream).

165 ^e IS*Aba*-1 upstream of the *bla*_{OXA-23} gene.

166 Table 1.

167

Isolate	ERIC type	Hospital/ State ^b	Date (m/y)	Clinical sample	IPM MIC ^c (µg/mL)	<i>bla_{OXA}</i> gene
01	A	I/SP	08/04	Tracheal secretion	>64	51, 58 ^d
1110	A1	II/SP	04/08	Urine	32	51, 23 ^e
919	A2	II/SP	05/08	Broncho-alveolar lavage	32	51, 23 ^e
39	B	III/SP	07/08	Blood	>32	51, 23 ^e
80	C	IV/SP	08/08	Sternal fluid	>32	51, 23 ^e
81	C	IV/SP	08/08	Wound secretion	>32	51, 23 ^e , 143
493	D	II/SP	08/08	Catheter tip	32	51, 23 ^e , 143
1031	E	II/SP	09/08	Urine	>64	51, 23 ^e , 143
906	E1	II/SP	06/08	Biliary secretion	32	51, 23 ^e
605	F	II/SP	08/08	Mediastinal fluid	>64	51, 143
770	F1	II/SP	07/08	Urine	>64	51, 143
1089	F2	II/SP	06/08	Blood	>64	51, 143
1020	F2	II/SP	09/08	Urine	>32	51, 143
559	F2	II/SP	09/08	Catheter tip	>64	51, 143
649	F2	II/SP	04/08	Wound secretion	>64	51, 143
736	F2	II/SP	08/08	Wound secretion	>64	51, 143
824	F2	II/SP	07/08	Catheter tip	>64	51, 143
580	F3	II/SP	06/08	Abdominal secretion	>64	51, 143
1013	F4	II/SP	05/08	Urine	>64	51, 143
803	F4	II/SP	08/08	Tracheal secretion	64	51, 143
804	F4	II/SP	09/08	Catheter tip	>64	51, 143
26	G	V/SP	08/08	Cervical secretion	>32	51, 143
28	G1	IV/SP	10/08	Tracheal secretion	>64	51, 143
45	G2	VI/SP	10/08	Broncho-alveolar lavage	>32	51, 143
30	H	III/SP	07/08	Scar secretion	>32	51, 23 ^e
659	H1	II/SP	04/08	Scar secretion	>64	51, 143
33	I	IV/SP	11/08	Catheter tip	>32	51, 143
55	J	VII/PR	01/08	Peritoneal fluid	16	51, 23 ^e
56	J	VII/PR	01/08	Sputum	16	51, 23 ^e
52	J1	VII/PR	01/08	Drain fluid	>32	51, 23 ^e
53	J1	VII/PR	02/08	Surgical fluid	32	51, 23 ^e
54	J1	VII/PR	12/07	Sputum	32	51, 23 ^e
3950	K	VIII/SP	09/07	Burn wound fluid	32	51, 72
4347	K	VIII/SP	11/07	Burn wound fluid	64	51, 72
34	L	V/SP	08/08	Catheter tip	>32	51, 143
46	M	VII/PR	08/07	Sputum	>32	51, 23 ^e