

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Karyne Rangel Carvalho

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E  
MOLECULAR DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E  
VIRULÊNCIA EM *ACINETOBACTER BAUMANNII* ISOLADOS EM HOSPITAIS DO  
RIO DE JANEIRO**

**RIO DE JANEIRO**

**2013**

Karyne Rangel Carvalho

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E  
MOLECULAR DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E  
VIRULÊNCIA EM *ACINETOBACTER BAUMANNII* ISOLADOS EM HOSPITAIS DO  
RIO DE JANEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientador: Dra. Marise Dutra Asensi

**Rio de Janeiro**

**2013**

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Carvalho, Karyne Rangel

Estudo da diversidade genética, caracterização fenotípica e molecular de mecanismos de resistência a antimicrobianos e virulência em *Acinetobacter baumannii* isolados em hospitais do Rio de Janeiro. / Karyne Rangel Carvalho. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

163f. : Il. tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2013.

Orientadora: Marise Dutra Asensi

1. *Acinetobacter baumannii* 2. Multirresistência 3. OXA-23 4. PFGE 5. MLST 6. Virulência.

Karyne Rangel Carvalho

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E VIRULÊNCIA EM *ACINETOBACTER BAUMANNII* ISOLADOS EM HOSPITAIS DO RIO DE JANEIRO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

---

Dr. Robson de Souza Leão  
Faculdade de Ciências Médicas (UERJ)

---

Dra. Ana Paula D'Allincourt Carvalho-Assef  
Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

Dedico este trabalho a meus amados filhos,  
marido e pais.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me mostrar o caminho certo e as pessoas certas.

Por ser a minha fortaleza e o meu ponto de equilíbrio nos momentos difíceis.

Aos meus filhos João Pedro e Izabella, presentes de Deus e razão da minha existência, pela compreensão e pelas horas que não pudemos ficar juntos.

Ao meu marido João Luiz, companheiro e amigo desta jornada, pelo amor, carinho e compreensão, sempre acreditando na minha capacidade.

Ao meu pai Kléber que me ensinou que a educação é aquilo que um ser humano pode receber de mais precioso na vida.

À minha mãe Sonia que sempre me acompanhou e me ajudou nos momentos em que mais precisei.

Tenham certeza que vocês são os responsáveis pela pessoa que eu sou. Muito obrigada por todo o apoio, essa conquista também pertence a vocês!!!

À minha orientadora, Dra. Marise, pela orientação e apoio durante todos estes anos, em que tenho desenvolvido pesquisa no LAPIH.

Aos integrantes e ex-integrante do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH): Liliane, Pollyana, Thiago, Carol, Melise, Julia, Paula, Vanessa, Jonathan, Fernanda, Jéssica, Isabel, Flávia, Ivson, Gabriela, Carlos, Carlos Equatoriano; pela convivência diária e pelos ensinamentos adquiridos com cada um.

Aos meus amigos dos outros laboratórios, pelas conversas nos corredores.

À querida Dra. Viviane, pela amizade, pelo convívio e pelo incrível apoio e ajuda nos momentos mais críticos.

À Dra. Ana Paula, por acreditar em mim, mesmo quando tudo estava dando errado. Eu não me esqueço!

À Dra. Luciana, que tive a oportunidade de conhecer, por estar sempre preparada para ajudar e ensinar algo, sempre prestativa e com boa vontade.

À querida Dra. Neide, que sempre ouviu e torceu por sua estagiária geminiana, e onde quer que esteja, tenho certeza que está muito feliz por mim.

À querida Dra. Maria Helena, por todos esses anos de apoio e amizade e por sempre me receber de braços abertos.

À Dra. Célia Romão, que me acompanha desde o início da minha jornada e sempre me auxiliou.

À Dra. Suzana Côrtes, pelo auxílio na microscopia de transmissão e de varredura, apesar de não ter entrado na tese.

À Dra. Denise Dagnino, pela simpatia e colaboração no quorum-sensing.

À Dra. Cristina Pessolani, por ceder o laboratório de Hanseníase e o material para os experimentos em cultura de células.

Ao Dr. Edson e a técnica Elaine do Laboratório de Enterovírus, por ceder a linhagem celular testada no início dos experimentos em cultura de células.

Ao setor Meio de Cultura do INCQS, pelo apoio na confecção de alguns meios de cultura.

Por fim, sinto-me feliz e realizada por ter chegado onde nunca pensei ser capaz, mas, com a certeza de ter sido verdadeira, humilde e perseverante na realização do meu trabalho, tenho o sentimento de dever cumprido.

A todas as pessoas que participaram diretamente ou indiretamente do meu trabalho, **MUITO OBRIGADA!**

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Tereza de Calcuta.

“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar”.

Esopo.

## RESUMO

*Acinetobacter baumannii* é um patógeno oportunista com crescente importância em infecções relacionadas a assistência em saúde. No Brasil é particularmente problemático devido à sua alta prevalência e multirresistência, com as carbapenemases tipo OXA representando o principal mecanismo responsável por esta resistência. Esse trabalho teve como objetivo determinar a diversidade genética, caracterizar fenotípica e molecularmente a resistência a antimicrobianos e avaliar fatores de virulência em *Acinetobacter baumannii* isolados de 10 hospitais públicos e privados no Rio de Janeiro no período de 2005 a 2007. Durante este período foram estudados 141 isolados de *A. baumannii* coletados de pacientes internados em UTIs ou enfermarias cirúrgicas. A identificação da espécie foi confirmada através da detecção do gene intrínseco *bla*<sub>OXA-51</sub>. Os 110 isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem apresentaram perfil de multirresistência com taxas superiores a 98,2% para 8 dos 10 antimicrobianos testados e 98(87,3%) produziram a carbapenemase OXA-23. Não houve produto de amplificação para os genes *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *Int1* pela técnica de PCR. As drogas com atividade *in vitro* foram a polimixina B e tigeciclina. Observou-se uma diversidade clonal, com a presença de 5 genótipos tipados por PFGE, com prevalência dos genótipos A (71,8%) e B(22,7%), presente em 7 e 5 hospitais, respectivamente. Dentre os 96 isolados produtores de OXA-23, foi selecionada uma cepa representativa de cada genótipo que foram submetidos a métodos de tipagem baseados em sequenciamento. Através do MLST (relacionado ao banco de dados Oxford) foram detectados quatro novos STs: ST131, ST132, ST133 e ST134 e quando utilizado o MLST-IP (desenvolvido pelo Instituto Pasteur) o ST79, ST15 e dois novos perfis alélicos foram detectados. Quatro SGs (SG1, SG4 e dois novos perfis) foram identificados, permitindo a associação de 70% dos isolados com o Clone Europeu II. O sequenciamento do gene *bla*<sub>OXA-51-like</sub> revelou a presença do gene *bla*<sub>OXA-66</sub>, *bla*<sub>OXA-95</sub> e *bla*<sub>OXA-132</sub>. O gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foi constantemente encontrado associado ao transposon *Tn2006* e estava cromossomicamente codificado em todos os isolados. Dentre os 31 isolados sensíveis ao imipenem, 5 apresentaram o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> e a seqüência de inserção *ISAb1*. Contudo, a associação desta seqüência ao gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foi detectada apenas nos isolados resistentes ao imipenem utilizados como controle. A seqüência de inserção *ISAb4* não foi encontrada em

nenhum isolado. Estes isolados apresentaram sensibilidade ao imipenem e meropenem, com CIM  $\leq 4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  para ambos antimicrobianos. Estes isolados produtores de *bla*<sub>OXA-23</sub> foram agrupados em 4 genótipos distintos (B, C, G and I). A maioria dos isolados incluídos neste estudo apresentou plasmídeo (83,7%), com 4 perfis distintos. Na pesquisa da produção de biofilme por ensaio colorimétrico utilizando cristal violeta foi possível observar a produção de biofilme em 96,5% dos isolados. Dois isolados representativos dos genótipos prevalentes foram avaliados quanto ao grau de associação à monocamada de células A-549 por citometria de fluxo, microscopia ótica e de fluorescência. A adesão foi observada em todas as metodologias, com baixas taxas de associação para o genótipo A (11,9%) e genótipos B (9,7%). A pesquisa de quorum-sensing, realizada com os mesmos isolados representativos dos genótipos prevalentes, foi negativa para a produção de AHL utilizando a cepa indutora *Agrobacterium tumefaciens* NT1. Enquanto o extrato do sobrenadante do controle positivo de *P. aeruginosa* PAO1 e os padrões de referência AHL-C8 e AHL-C12 foram positivos. Os dados deste estudo são relevantes para a Saúde Pública, pois permitem o conhecimento da epidemiologia molecular desta espécie, bem como o de alguns fatores de virulência, que têm sido pouco descritos no Brasil, permitindo assim reforçar o monitoramento e implementar medidas de controle.

Palavras-chaves: *Acinetobacter baumannii*, multirresistência, OXA-23, PCR, PFGE, MLST, Virulência.

## ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen with increasing importance in hospital infections. In Brazil, it is particularly problematic because of its high prevalence and multidrug resistance, with the OXA-type carbapenemases representing the main mechanism responsible for such resistance. This study aimed to determine the genetic diversity, as well as phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and evaluation of virulence factors in *Acinetobacter baumannii* isolated from 10 public and private hospitals in Rio de Janeiro from 2005 to 2007. During this period 141 isolates of *A. baumannii* collected from patients admitted to ICUs or surgical wards have been studied. Species identification has been confirmed by detection of gene intrinsic *bla*<sub>OXA-51</sub>. The 110 isolates of *A. baumannii* resistant to imipenem showed multidrug resistance profile with rates above 98.2% for 8 of the 10 antibiotics tested and 98 (87.3%) produced the carbapenemase OXA-23. There was no amplification product for genes *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *Int1* by PCR. The drugs with in vitro activity were polymyxin B and tigecycline. There was a clonal diversity, the presence of five genotypes typed by PFGE, with a prevalence of genotypes A (71.8%) and B (22.7%), present in 7 and 5 hospitals, respectively. Among the 96 strains producing OXA-23, one representative for each genotype that were subjected to typing methods based on sequencing was selected. By MLST (related to the database Oxford) four new STs were detected: ST131, ST132, ST133 and ST134 and when using the MLST-IP (developed by Institut Pasteur) the ST79, ST15 and two new allelic profiles were detected. Four SGs (SG1, SG4 and two new profiles) have been identified, allowing the association of 70% of isolates with the European Clone II. Sequencing of the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene revealed the presence of *bla*<sub>OXA-66</sub>, *bla*<sub>OXA-95</sub> and *bla*<sub>OXA-132</sub>. The *bla*<sub>OXA-23</sub> gene was consistently found associated with the transposon *Tn2006* and was chromosomally encoded in all isolates. Of 31 isolates susceptible to imipenem, 5 showed the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene and the insertion sequence *ISAb1*. However, the association of this sequence to the gene *bla*<sub>OXA-23</sub> was detected only in isolates resistant to imipenem used as controls. The *ISAb4* insertion sequence was not found in any isolated. These isolates were susceptible to imipenem and meropenem, with MICs  $\leq$  4 mg / mL for both antimicrobials. These isolates producing *bla*<sub>OXA-23</sub> have been grouped into four distinct genotypes (B, C, G and I). Most isolates included in this study had plasmid (83.7%), with profiles ranging from 1 to 4. In search of biofilm production by colorimetric assay using crystal violet it was possible to observe the production of biofilm in 96.5% of isolates. Two representative isolates of the prevalent genotypes were evaluated for the degree of association at monolayer of A-549 cells by flow cytometry, and fluorescence optical microscopy. The adhesion was observed in all methodologies, with low rates of

association for genotype A (11.9%) and genotype B (9.7%). The search for quorum-sensing carried out with representative isolates of the same prevalent genotypes were negative for the production of AHL inducer using *Agrobacterium tumefaciens* strain NT1. While the extract of the supernatant of the positive control of *P. aeruginosa* PAO1 and the reference standard AHL-C8 and AHL -C12 were positive. Data from this study are relevant to public health because they allow the knowledge of the molecular epidemiology of this species, as well as some of the virulence factors, which have been rarely described in Brazil, thus enhancing the monitoring and implementing control measures.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, multidrug resistance, OXA-23, PCR, PFGE, MLST, virulence.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Resumo da distribuição e contexto genético das enzimas do tipo OXA em *A. baumannii*.....47
- Figura 2.** Percentual de distribuição dos 141 isolados de *A. baumannii* coletado por hospital público ou privado. ....86
- Figura 3.** Perfil de Resistência aos Antimicrobianos dos 110 isolados de *A.baumannii* IPM-R.....87
- Figura 4.** Polimorfismo genético de *A. baumannii* isolados de pacientes atendidos em oito hospitais no Rio de Janeiro, detectado através de eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão do DNA cromossômico com endonuclease de restrição *Apal*.....90
- Figura 5.** Agrupamento dos STs (MLST-OD) do *A. baumannii* por e-Burst, com 185 perfis de MLST representando 304 isolados da base de dados.....92
- Figura 6.** Polimorfismo genético dos isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23 resistentes e sensíveis ao imipenem detectados através de eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão do DNA com enzima de restrição *Apal*.....94
- Figura 7.** Histograma com percentual representativo de células não infectadas por células associadas a *A. baumannii* coradas com corante verde PKH-2 (Sigma) com 2 horas de infecção (n=2).....97
- Figura 8.** Taxa de associação do *A. baumannii* com células epiteliais alveolares com 2 horas de infecção (n=3).....98
- Figura 9.** Célula A-549 infectada por 2h com *A. baumannii* fotografadas no microscópio óptico com lente de imersão em um aumento de 1000x.....99

**Figura 10.** Célula A-549 infectada por 2h com *A. baumannii* marcadas com corante fluorescente PKH-2 fotografada no microscópio de fluorescência com lente de imersão (Nikon Eclipse E400) em um aumento de 1000x.....101

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Esquema de classificação das beta-lactamases adaptado da tabela original de Bush e Jacoby, 2010.....	36
---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Diferenciação fenotípica das espécies genômicas do complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> – <i>A. baumannii</i> .....	33
<b>Tabela 2.</b> Subgrupos de OXA-carbapenemases identificadas em <i>A. baumannii</i> .....	46
<b>Tabela 3.</b> Acil Homoserina Lactonas produzidas por <i>A. baumannii</i> .....	65
<b>Tabela 4.</b> Iniciadores utilizados nas reações de PCR.....	73
<b>Tabela 5.</b> Fragmento de genes conservados utilizados para o <i>Acinetobacter baumannii</i> no MLST-OD.....	77
<b>Tabela 6.</b> Fragmento de genes conservados utilizados para o <i>Acinetobacter baumannii</i> no MLST-IP.....	78
<b>Tabela 7.</b> Susceptibilidade a 12 antimicrobianos dos 110 isolados <i>A. baumannii</i> resistentes ao imipenem.....	88
<b>Tabela 8.</b> Caracterização dos isolados de <i>A. baumannii</i> resistentes ao imipenem produtores de OXA-23.....	89
<b>Tabela 9.</b> Relação entre genótipos por PFGE, STs, tipagem do gene <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> e SGs obtidos dos isolados clínicos de <i>A. baumannii</i> produtores de OXA-23 de acordo com o ano de isolamento.....	91
<b>Tabela 10.</b> Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos 5 isolados sensíveis ao imipenem, produtores de OXA-23.....	93
<b>Tabela 11.</b> Caracterização dos 31 isolados de <i>A. baumannii</i> sensíveis ao imipenem produtores ou não de OXA-23.....	94
<b>Tabela 12.</b> Perfil plasmidial dos 141 isolados de <i>A. baumannii</i> distribuído entre os genótipos encontrados.....	95

**Tabela 13.** Formação de biofilme dos 141 isolados de *A.baumannii*.....96

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\mu$	microlitro
<b>ABRC</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenemas
<b>Acb</b>	Complexo <i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i>
<b>ADC</b>	<i>Acinetobacter</i> derived cephalosporinase
<b>AFA</b>	Antifading
<b>AFLP</b>	Amplified fragment length polymorphism
<b>AHL</b>	Acil homoserina lactona
<b>AIM</b>	Australian imipenemase
<b>AK</b>	Amicacina
<b>AMH</b>	Agar Mueller-Hinton
<b><i>AmpC</i></b>	Beta-lactamase cromossômica
<b>ANVISA</b>	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AP-PCR</b>	Arbitrarily Primed - PCR
<b>ARDRA</b>	Amplified ribosomal DNA restriction analysis
<b>ARI</b>	<i>Acinetobacter</i> resistente ao imipenem
<b>ATCC</b>	American Type and Culture Collection
<b>ATM</b>	Aztreonam
<b>BHI</b>	Agar infusão cérebro-coração
<b><i>bla</i></b>	Genes das beta-lactamases
<b>BLAST</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>BSC</b>	Tampão Tris:EDTA
<b>C<sub>8</sub>-HSL</b>	N-octanoil-DL-homoserina lactona
<b>C<sub>12</sub>-HSL</b>	N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Cálcio
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cálcio
<b>CAZ</b>	Ceftazidima
<b>CC</b>	Complexo clonal
<b>CCBH</b>	Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar
<b>CCBS</b>	Coleção de Cultura de Bactérias de Interesse em Saúde
<b>CCIH</b>	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention

<b>CFF</b>	Cromatografia de fase fina
<b>CG</b>	Cassete gênico
<b>CGLAB</b>	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>CIT</b>	Citrato de Simmons
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standards Institute
<b>CLIST</b>	Coleção de <i>Listeria</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>COCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	Cloreto de cobalto hexahidratado
<b><i>cpn60</i></b>	60-kDa chaperonin
<b>CraA</b>	<i>Acinetobacter</i> resistente a clorafenicol
<b>CRAb</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos
<b>COL</b>	Colistina
<b>CTI</b>	Centro de Tratamento Intensivo
<b>CTX</b>	Cefotaxima
<b>CTX-M</b>	Beta-lactamase Cefotaximase
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	Sulfato de cobre pentahidratado
<b>CV</b>	Meio de Costa e Vernin
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina Trifosfatada
<b>dCTP</b>	Desoxicitosina Trifosfatada
<b>dGTP</b>	Desoxiguanidina Trifosfatada
<b>DIM</b>	Dutch imipenemase
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMT</b>	Transportador droga/metabólito
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	Desorribonucleotídeo trifosfatado
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>DOc</b>	Densidade ótica do controle negativo
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>dTTP</b>	Desoxitimina Trifosfatada
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético

<b>EMB</b>	Eosin Methylene- blue Agar
<b>ERIC-PCR</b>	<i>Enterobacterial</i> Repetitive Intergenic Consensus
<b>ESBL</b>	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
<b>EUI</b>	Clone Europeu I
<b>EUII</b>	Clone Europeu II
<b>EUIII</b>	Clone Europeu III
<b>FEP</b>	Cefepime
<b>FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O</b>	Sulfato ferroso heptahidratado
<b>FR</b>	Fator de Retenção
<b><i>fusA</i></b>	protein elongation factor EF-G
<b><i>gdhB</i></b>	Glucose dehydrogenase B
<b>GES</b>	Guiana extended spectrum beta-lactamase
<b>GIM</b>	Germany imipenemase
<b><i>gltA</i></b>	Citrate synthase
<b><i>gpi</i></b>	Glucose-6-phosphate isomerase
<b><i>gyrB</i></b>	DNA gyrase subunit B
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	Ácido bórico
<b>HMP</b>	Heat-modifiable protein
<b>ICs</b>	Integrans cromossômicos
<b>ICS</b>	Infecção de corrente sanguínea
<b>IH</b>	Infecção hospitalar
<b>IM</b>	Integrans móveis
<b>IMP</b>	imipenemase
<b>IOC</b>	Instituto Oswaldo Cruz
<b>IPM</b>	Imipenem
<b>IRAS</b>	Infecção relacionada a assistência a saúde
<b>IS</b>	Sequencia de inserção
<b>IS<i>Aba</i></b>	Sequência de Inserção de <i>Acinetobacter baumannii</i>
<b>ITs</b>	Região intergênica
<b>kDa</b>	Quilodaltons
<b>KHM</b>	Kyorin Hospital metalo-β-lactamase
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Hidrogeno fosfato de potássio
<b>KI</b>	Iodeto de potássio

<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
<b>LACEN</b>	Laboratório Central de Saúde Pública
<b>LAPIH</b>	Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
<b>LB</b>	Caldo Luria-Bertani
<b>LGB</b>	Laboratório de genética bacteriana
<b>MATE</b>	Efluxo de multidrogas e moléculas tóxicas
<b>MBL</b>	Metalo beta lactamase
<b>MDR</b>	Multirresistente
<b>MEM</b>	Meropenem
<b>MeOH</b>	Acetato de etila
<b>MEV</b>	Microscópio eletrônico de varredura
<b>MF</b>	Facilitador maior
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	Magnésio
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnésio
<b>MGTs</b>	Monofunctional transglycosylases
<b>MIC</b>	Concentração mínima inibitória
<b>MLEE</b>	Multilocus enzyme electrophoresis
<b>MLST</b>	Multilocus sequence typing
<b>MLST-IP</b>	MLST desenvolvido pelo Instituto Pasteur
<b>MLST-OD</b>	MLST relacionado ao banco de dados Oxford
<b>MMAT</b>	Meio para cultivo em “ <i>quorum sensing</i> ”
<b>2MP</b>	Ácido 2-mercaptopropiônico
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de manganês
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>MYSTIC</b>	Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Hidrogênio fosfato dissódico
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NDM</b>	New Delhi Metalo-beta-lactamase
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloreto de amônio
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	Molibdato de Amônio
<b>NNIS</b>	National Nosocomial Infections Surveillance

<b>NT1</b>	Cepa indicadora <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OMPs</b>	Outer membrane proteins
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana da Saúde
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>OXA</b>	Oxacilinase
<b>PAV</b>	Pneumonia associada à ventilação mecânica
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PB</b>	Polimixina B
<b>PBP2</b>	Proteína Ligadora de Penicilina tipo 2
<b>PBPs</b>	Proteínas ligadoras de penicilina
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PCIH</b>	Programa de Controle de Infecções Hospitalares
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PDR</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i> pandrug-resistentes
<b>PEES</b>	Antibióticos penicilina e estreptomicina
<b>PER</b>	<i>Pseudomonas</i> Extended Resistance
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PFGE</b>	Eletroforese em gel de campo pulsado
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>pl</b>	ponto isoelétrico
<b>PKH-2</b>	Kit marcação celular fluorescente
<b><i>pyrG</i></b>	CTP synthase
<b>QS</b>	<i>Quorum sensing</i>
<b>RAPD</b>	Randomly amplified polymorphic DNA
<b><i>recA</i></b>	Homologous recombination factor
<b>Rede RM</b>	Resistência Microbiana em Serviços de Saúde
<b>REP-PCR</b>	Repetitive extragenic palindromic-PCR
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RND</b>	Resistência, nodulação e divisão
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b><i>rplB</i></b>	50S ribosomal protein L2
<b><i>rpoB</i></b>	RNA polymerase subunit B

<b><i>rpoD</i></b>	RNA polymerase sigma factor
<b>SAM</b>	Ampicilina/sulbactam
<b>SCO</b>	Nova Beta-lactamase de classe A
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SENTRY</b>	SENTRY Antimicrobial surveillance programme
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SG</b>	Sequência do grupo
<b>SHV</b>	Beta-lactamase <i>Sulphydryl variable</i>
<b>SIM</b>	Seoul imipenemase
<b>SIs</b>	Super-integrans
<b>SMR</b>	Pequena multirresistência
<b>SPM</b>	São Paulo metalo-beta-lactamase
<b>ST</b>	Sequence type
<b>SXT</b>	Sulfametoxazole/ Trimetoprima
<b>TBE</b>	Tampão Tris-borato EDTA
<b>TE</b>	Tampão Tris-EDTA
<b>TEM</b>	Beta-lactamase Temoneira
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>TSB</b>	Caldo tríptico de soja
<b>TTC</b>	Tetrafenil Tetrazolio
<b>TU</b>	Tjinberg e Ursing
<b>TZP</b>	Piperacilina/tazobactam
<b>UCISA</b>	Unidade de Controle de Infecções em Serviços de Saúde
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>USA</b>	Estados Unidos
<b>UTI</b>	Unidade de terapia intensiva
<b>VEB</b>	Vietnemesa extended-spectrum beta-lactamase
<b>VIM</b>	Verona imipenemase
<b>VNTR</b>	Variable Number of Tandem Repeat
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-indolil-b-d-galactopiranosideo
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Zinco
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	Sulfato de zinco heptahidratado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	29
2.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO.....	29
2.2 TAXONOMIA.....	29
2.3 HABITAT NATURAL DO GÊNERO <i>ACINETOBACTER</i> .....	31
2.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS.....	32
2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ASSOCIADOS AOS ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS.....	34
2.5.1 Produção de Beta-lactamases.....	35
2.5.1.1 <i>Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBLs)</i> .....	37
2.5.1.2 <i>Metallo-beta-lactamases</i> .....	39
2.5.1.3 <i>Beta-lactamases do tipo AmpC</i> .....	41
2.5.1.4 <i>Oxacilinas</i> .....	42
2.5.2 Alteração das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs).....	47
2.5.3 Diminuição da expressão de porinas (OMPs).....	48
2.5.4 Hiperexpressão de bomba de efluxo.....	49
2.6 IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL DE BETA-LACTAMASES.....	49
2.6.1 Testes fenotípicos.....	49
2.6.2 Reação em cadeia da polimerase para detecção de Beta-lactamases.....	50
2.7 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ASSOCIADOS A OUTROS ANTIMICROBIANOS.....	50
2.7.1 Aminoglicosídeos.....	50
2.7.2 Fluoroquinolonas.....	51
2.7.3 Tetraciclina.....	52
2.7.4 Polimixina.....	52
2.8 ESTRUTURAS DE DNA QUE DISSEMINAM RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	53
2.8.1 Integrons.....	53
2.8.2 Sequência de Inserção (SI) .....	55
2.9 MÉTODOS DE TIPAGEM MOLECULAR.....	56
2.9.1 Análise Plasmidial.....	57
2.9.2 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) .....	58

2.9.3 Métodos de tipagem molecular baseados em PCR.....	59
2.9.4 Outros Métodos de Tipagem Molecular.....	60
2.10 FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE EM <i>A. baumannii</i> .....	61
2.10.1 Aderência e biofilme.....	62
2.10.2 <i>Quorum sensing</i> .....	63
2.11 CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR NO BRASIL.....	65
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	68
3.1 OBJETIVO GERAL.....	68
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	68
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	69
4.1 ISOLADOS BACTERIANOS.....	69
4.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	69
4.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	70
4.4 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES E METALO-BETA-LACTAMASES (MBL).....	71
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL POR TIOCIANATO DE GUANIDINA.....	71
4.6 PESQUISA DE SEQUÊNCIAS GÊNICAS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	72
4.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	74
4.8 SEQUENCIAMENTO.....	74
4.9 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE).....	74
4.10 DETERMINAÇÃO DO ST PELO MÉTODO DE “MULTILOCCUS SEQUENCE TYPING” (MLST).....	75
4.11 ANÁLISE DE DADOS.....	76
4.12 ANÁLISE DO PERFIL PLASMIDIAL.....	78
4.13 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	79
4.14 ADERÊNCIA EM CULTURA DE CÉLULAS.....	80
4.14.1 Isolados bacterianos.....	80
4.14.2 Cultivo e manutenção de células epiteliais alveolares.....	81
4.14.2.1. <i>Meio de cultivo de células eucarióticas</i> .....	81
4.14.2.2 <i>Linhagem celular</i> .....	81
4.14.2.3 <i>Marcação de bactérias com kit PKH-2 fluorescente</i> .....	81
4.14.2.4 <i>Preparo das amostras de A. baumannii</i> .....	82
4.14.3 Avaliação do grau de associação das bactérias .....	82

4.14.3.1 <i>Citometria de Fluxo</i> .....	82
4.14.3.2 <i>Microscopia Óptica</i> .....	83
4.14.3.3 <i>Microscopia de Fluorescência</i> .....	83
4.15 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>QUORUM SENSING</i> .....	83
4.15.1 Preparo e concentração do extrato de <i>A. baumannii</i> .....	85
4.15.2 Preparo das amostras.....	85
4.15.3 Ensaio de detecção do autoindutor.....	85
<b>5 RESULTADOS</b> .....	86
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	103
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	117
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	118
<b>APÊNDICES</b>	
<b>APÊNDICE A-</b> CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NO 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA .....	148
<b>APÊNDICE B-</b> CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NO V SIMPÓSIO BRASILEIRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA .....	149
<b>APÊNDICE C-</b> CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NO 26º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. ....	150
<b>APÊNDICE D-</b> CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NO 26º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA .....	151
<b>APÊNDICE E-</b> CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NO XXI CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA .....	152
<b>APÊNDICE F-</b> ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL AND ANTIMICROBIAL AGENTS.....	153
<b>APÊNDICE G-</b> ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AND CHEMOTHERAPY.....	157
<b>APÊNDICE H-</b> ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ.....	161
<b>APÊNDICE I-</b> ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ.....	163

## 1 INTRODUÇÃO

*Acinetobacter baumannii* é um patógeno oportunista com crescente importância em infecções relacionadas a assistência em saúde (IRAS), ocorrendo, em sua maioria, nas unidades de terapia intensiva (UTIs). Este micro-organismo é endêmico em várias localizações geográficas, apresentando prevalência superior a 10% dentre os isolados Gram negativos. *A. baumannii* está particularmente associado à pneumonia, septicemia, meningite e infecção do trato urinário (GAYNES; EDWARDS, 2005).

Dados do sistema *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS) entre os anos de 1975 e 2003 mostram aumento significativo das infecções causadas por *Acinetobacter spp.* nos hospitais americanos. Esse relato evidenciou aumento de 1,5% para 6,9% das pneumonias hospitalares, 1,8% para 2,4% das infecções de corrente sanguínea, 0,5% para 2,1% das infecções de sítios cirúrgicos e um aumento de 0,6% para 1,6% das infecções de trato urinário causadas por este agente (SLAMA, 2008). Estudo do programa SENTRY no período de 2003 a 2008 em hospitais brasileiros, mostra que *Acinetobacter spp.* foi o quarto patógeno (8%) mais comum entre os bacilos Gram negativos recuperados de infecções da corrente sanguínea, apresentando altas taxas de resistência a todos os antimicrobianos, exceto a polimixina B (ANDRADE, 2008).

Dados preliminares da Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, obtidos no período de julho de 2006 a junho de 2008, onde foram monitoradas as infecções primárias da corrente sanguínea em pacientes internados em UTIs de 97 hospitais sentinelas do Brasil, mostraram *Acinetobacter spp.* como o terceiro patógeno mais frequente (BRASIL, Rede RM, 2009).

A colonização por *A. baumannii* é mais comum que a infecção, sugerindo que a patogenicidade desta espécie seja geralmente baixa. Entretanto, uma vez instalada a infecção, esta pode se agravar (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

A habilidade do *A. baumannii* de sobreviver em superfícies secas e inanimadas aliada à capacidade em adquirir multirresistência aos antimicrobianos contribuem para o tempo de sobrevivência no ambiente hospitalar (AYAN et al, 2003). A sua elevada versatilidade nutricional e metabólica também pode contribuir para sua proliferação em enfermarias e entre pacientes (AYAN et al, 2003).

Nas últimas décadas, devido à grande utilização de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente em UTIs, tem-se observado, mundialmente, a emergência de bastonetes Gram negativos multirresistentes, inclusive *A. baumannii* (SADER et al, 2004).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO

O gênero *Acinetobacter* é caracterizado por cocobacilos Gram negativos, aeróbios estritos, imóveis e metabolismo oxidativo, não fermentativo. Apresentam as reações de oxidase negativa e catalase positiva, possuindo 39 a 47% moles de conteúdo GC (guanina e citosina) em seu DNA. Espécies do gênero *Acinetobacter* crescem bem em meio de cultura sólido, rotineiramente utilizado em laboratórios de microbiologia clínica. No ágar sangue, formam colônias branco-acinzentadas e, no ágar MacConkey, formam colônias de coloração levemente rosa devido à pouca oxidação da lactose, convexas, translúcidas e opacas (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). A produção de pigmento marrom pode ser observada em algumas amostras ambientais (PAGEL; SEYFRIED, 1976). Este gênero pertence à família *Moraxellaceae* que inclui ainda os gêneros *Moraxella* e *Psychrobacter* (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

### 2.2 TAXONOMIA

A taxonomia do gênero *Acinetobacter* tem passado por uma série de modificações desde que foi isolado do solo em 1911 pelo microbiologista holandês Beijerinck. Na época, o micro-organismo foi denominado de *Micrococcus calcoaceticus* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Entretanto, com o passar dos anos, novos micro-organismos com características semelhantes foram sendo descobertos e descritos, entre eles: *Diplococcus mucosus*, *M. calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Myma polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Moraxella lwoffii* *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*, *Neisseria winogradskyl*, *Achromobacter anitratum* e *Achromobacter mucosus* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

A designação do termo *Acinetobacter* spp. (oriundo do grego *akinetos*: não móveis) foi proposta por Brisou e Prevout, em 1954, quando diferentes espécies foram agrupadas de acordo com suas características fenotípicas (BRISOU; PREVOT, 1954; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). No entanto,

apenas a partir de 1968, essa nomenclatura tornou-se aceita. O gênero *Acinetobacter* foi reconhecido oficialmente em 1971 pelo Subcomitê em Taxonomia de Moraxella e outras bactérias similares, após a publicação dos resultados obtidos por Baumann e colaboradores (1968), os quais avaliaram as características bioquímicas do micro-organismo e concluíram que este representava um novo gênero, *Acinetobacter*, contendo apenas a espécie *Acinetobacter calcoaceticus* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; BAUMANN; DOUDOROFF; STANIER, 1968).

Com a evolução das técnicas de biologia molecular, Bouvet e Grimont (1986) descreveram a presença de 12 grupos distintos de espécies genômicas por hibridização DNA-DNA, diferenciadas por 28 testes fenotípicos, os quais receberam nomes formais, incluindo *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* e *A. lwoffii* (BOUVET; GRIMONT, 1986; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

A partir desta classificação, diferentes estudos identificando novas espécies foram publicados. Nishimura e colaboradores (1988) identificaram através de métodos fenotípicos e hibridização uma nova espécie resistente a raios gama, isolada de solo e algodão (*Acinetobacter radioresistens* sp.) (NISHIMURA; INO; IIZUKA, 1988). No ano seguinte, a classificação dos grupos de DNA, realizada por Tjernberg e Ursing (1989), foi feita de acordo com a classificação já existente de Bouvet e Grimont, e 3 novos grupos foram numerados (13 a 15) (TJERNBERG; URSING, 1989). No mesmo ano, Bouvet e Jeanjean também estudaram espécies desse micro-organismo pela mesma metodologia e relataram cinco grupos de DNA (13 a 17) entre as cepas de *Acinetobacter* proteolíticas (BOUVET; JEANJEAN, 1989).

Em particular, *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. baumannii*, genomospécie 3 e genomospécie 13TU são difíceis de separar a partir de testes convencionais e sistema de hibridização do DNA. Portanto, devido à dificuldade de diferenciação e das similaridades fenotípicas e genotípicas do grupo, foi proposto que estas fossem agrupadas em um conjunto denominado complexo *A. calcoaceticus-A.baumannii* (Acb), apesar de serem geneticamente distintas (BOUVET; GRIMONT, 1986; GERNER-SMIDT; TJERNBERG; URSING, 1991; DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). Do ponto de vista clínico, esse agrupamento não é adequado, uma vez que o complexo combina três das espécies clínicas mais relevantes (*A.*

*baumannii*, genomoespécie 3 e genomoespécie13TU) e uma espécie ambiental (*A.calcoaceticus*) (GERNER-SMIDT; TJERNBERG; URSING, 1991; DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007).

Recentemente, foram propostas as denominações de *A. pittii* e *A. nosocomialis* para as espécies *A. genomoespécie 3* e *A. genomoespécie 13TU* respectivamente (NEMEC et al, 2011).

Atualmente, o gênero *Acinetobacter* é composto por pelo menos 37 espécies diferentes, sendo 28 espécies com nomes oficialmente reconhecidos (<http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>. Acesso em: 17/01/2013) e 15 espécies descritas como genomoespécies, delineadas por hibridização DNA-DNA (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007).

### 2.3 HABITAT NATURAL DO GÊNERO ACINETOBACTER

Este grupo de bactérias é amplamente encontrado na natureza devido à sua grande habilidade em utilizar variadas fontes de carbono para o seu crescimento e por apresentar inúmeras vias metabólicas, adaptando-se facilmente em diferentes ambientes. *Acinetobacter* pode ser isolado de solo, na água, em alimentos, na microbiota de humanos e de animais (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008).

As espécies mais comumente encontradas na natureza são *A. calcoaceticus*, *A. johnsonii*, *A. Iwoffii*, *A. radioresistens* e *Acinetobacter pittii*, já *A.baumannii*, *A. johnsonii*, *A. Iwoffii* e *A. radioresistens* são espécies mais comumente encontradas como colonizantes da pele humana. Em dois estudos europeus, *Acinetobacter Iwoffii* foi a espécie mais predominante encontrada na pele de indivíduos saudáveis, com taxas de colonização de 29% e 58%, enquanto que outras espécies de *Acinetobacter* foram detectadas em menor frequência (SEIFERT et al, 1993; BERLAU et al, 1999).

*A. baumannii*, *A. nosocomialis* e *A. pittii* são as espécies mais encontradas na clínica humana (TJERNBERG; URSING, 1989; GERNER-SMIDT, TJERNBERG; URSING, 1991; SEIFERT et al, 1993; DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007), porém, estas espécies têm sido encontradas em porcentagens variáveis em vegetais, carne, peixe e solo (BERLAU et al, 1999; HOUANG et al, 2001).

*A. baumannii* também foi coletado no corpo de piolhos em pessoas desabrigadas (LA SCOLA; RAOULT, 2004), em aquacultura de peixe e em fazendas de camarão no Sudeste da Ásia (HUYS et al, 2007) e em água residual de hospital (CHAGAS et al, 2011). Também foram associados a infecções e à propagação epidêmica em animais de uma clínica veterinária (BOERLIN et al, 2001). No ambiente hospitalar, algumas espécies tem sido isoladas de leitos, bancadas, equipamentos médicos, sistemas de circulação de ar e ventiladores (TJERNBERG; URSING, 1989; BERNARDS et al, 2004; DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; BARCHITTA et al, 2009).

## 2.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS

Dentre os métodos de identificação, observa-se que os sistemas clássicos, assim como os sistemas comerciais utilizados na bacteriologia, não são satisfatórios em decorrência do crescente número de descrição de novas espécies de *Acinetobacter*, dificultando a constante atualização dos métodos fenotípicos (DORTET et al, 2006). Deste modo, a ausência de critérios fenotípicos inequívocos para a diferenciação de espécies estreitamente relacionadas é típico para espécies do complexo Acb e também tem sido observado entre outras espécies do gênero *Acinetobacter* (BOUVET; JEANJEAN, 1989; NEMEC et al, 2010) ou outros patógenos humanos importantes (VANDAMME et al, 2003).

Em microbiologia médica, o grande problema está na dificuldade de distinguir por características fenotípicas, as três espécies clinicamente mais relevantes - *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* e também aquelas de origem ambiental - *A. calcoaceticus*, que fazem parte do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (Acb) por serem intimamente relacionadas (Tabela 1) (GERNER-SMIDT; TJERNBERG; URSING, 1991; GARRITY et al, 2005, DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007).

Para solucionar os problemas na determinação das espécies bacterianas do gênero *Acinetobacter*, várias técnicas moleculares têm sido descritas em diversos estudos (NEMEC et al, 2003; DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; NEMEC et al, 2011).

Atualmente estão disponíveis diversos métodos genotípicos para a identificação prática e confiável das espécies do complexo Acb: a ribotipagem (GERNER-SMIDT, 1992); a técnica de ARDRA que realiza a análise dos fragmentos

de restrição obtidos a partir da restrição enzimática do produto resultante da amplificação do DNA codificador do RNA ribossômico da subunidade 16S (DIJKSHOORN et al, 1998); métodos baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) onde são utilizados diferentes iniciadores (primers) capazes de amplificar regiões específicas de cada espécie (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007); e análise por Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; VAN DEN BROEK et al 2009). Mais recentemente, tem-se utilizado métodos baseados em sequenciamento através da análise de diversas sequências do DNA, como o sequenciamento da região intergênica entre os genes codificadores do RNA ribossômico 16S e 23S (ITs) (CHANG, H.C. et al, 2005), do gene *recA* que codifica a proteína *recA* (KRAWCZYK et al, 2002), do gene *gyrB* que codifica a subunidade B da enzima DNA girase (YAMAMOTO; BOUVET; HARAYMA et al, 1999) ou análise da sequência do gene *rpoB* que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (GUNDI et al, 2009).

**Tabela 1.** Diferenciação fenotípica das espécies genômicas do complexo *Acinetobacter calcoaceticus* – *A. baumannii*.

Características	Espécies genômicas			
	<i>A.calcoaceticus</i>	<i>A.baumannii</i>	<i>A. pittii</i>	<i>A. nosocomialis</i>
Crescimento a 41°C	[-]	+	V	+
Crescimento a 44°C	-	+	-	V
Crescimento em:				
L-Arabinose	V	[+]	V	+
D-Glucorato	V	[+]	[+]	[-]
D-Ribose	V	[+]	V	[+]
Ácido Sórbico	[-]	V	[-]	[+]
Glicerato	[+]	[-]	V	[-]
Levulinato	V	V	-	[-]
L-Tartarato	[-]	V	[+]	[-]
Acetil-L-Glutamina	[-]	V	V	V
D-Asparagina	+	-	-	[-]
L-Hidroxirolina	[-]	[+]	[-]	V

Adaptado de GARRITY et al, 2005.

Símbolos: + = todas as cepas positivas; [+]= 80% ou mais positivas; V= 20-79% positivas; [-]= 20% ou menos negativas; -+ todas as cepas negativas.

Até recentemente, a identificação da espécie *A. baumannii* também podia ser confirmada através da pesquisa do gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, intrínseco da espécie (HERITIER et al, 2005). Entretanto, esta carbapenemase originalmente intrínseca ao *Acinetobacter baumannii*, foi recentemente descrita, codificada em plasmídeo, em isolados clínicos de *Acinetobacter nosocomialis* e um clone de genomoespécie próxima ao 13TU (LEE, Y.T. et al, 2009; 2012).

## 2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ASSOCIADOS AOS ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS

A resistência bacteriana a antimicrobianos vem se tornando um importante problema no Brasil e em diversos países do mundo. Nos últimos anos, devido ao uso extensivo de agentes antimicrobianos nos hospitais, incluindo beta-lactâmicos de espectro estendido, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, tem-se observado um aumento expressivo de linhagens resistentes a diversos antimicrobianos associados a surtos (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; GIAMARELLOW; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU, 2008).

*Acinetobacter spp.*, além de possuir resistência intrínseca a uma grande variedade de antimicrobianos, demonstra um grande potencial para a aquisição de novos determinantes de resistência, respondendo rapidamente à pressão seletiva do meio ambiente (BERGOGNE- BEREZIN; TOWNER, 1996; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). *Acinetobacter baumannii*, intrinsecamente resistente a múltiplas drogas, pode apresentar inúmeros mecanismos de resistência contra virtualmente todos os antimicrobianos comercialmente disponíveis para o seu tratamento (ZAVASCKI et al, 2010).

Os principais mecanismos de resistência observados em *Acinetobacter spp.* são: (i) produção de Beta-lactamases; (ii) impermeabilidade da membrana externa associada a perda ou diminuição na expressão de porinas; (iii); hiperexpressão de bombas de efluxo (HIGGINS et al, 2004; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

### 2.5.1 Produção de Beta-lactamases

O principal mecanismo de resistência das bactérias Gram negativas aos antibióticos beta-lactâmicos é decorrente da produção de enzimas, conhecidas como Beta-lactamases, que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico (LIVERMORE, 1995). As beta-lactamases, nas bactérias Gram negativas, são encontradas no espaço periplasmático e podem alcançar maiores concentrações e agir com mais eficiência nos antimicrobianos que estão atravessando este espaço para atingir as proteínas de ligação à penicilina (PLPs) (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). A capacidade das beta-lactamases em conferir resistência irá depender da quantidade de enzima produzida, da sua habilidade em hidrolisar o antimicrobiano em questão, e da velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa bacteriana (LIVERMORE, 2001).

Devido ao crescente número de beta-lactamases identificadas e à diversidade de características bioquímicas e moleculares, diferentes esquemas de classificação destas enzimas foram propostos ao longo dos anos. A primeira classificação proposta por Ambler em 1980, baseado nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos das enzimas, descreveu quatro classes moleculares: A) serino Beta-lactamases, incluindo as beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs), penicilinases e carbenicilinases; B) metalo-beta-lactamases; C) cefalosporinases cromossomais; e D) oxacilinases (AMBLER, 1980).

Em 1989, foi proposta uma classificação por Bush que agrupou as enzimas em quatro grupos definidos de acordo com o substrato e os perfis de inibição (BUSH, 1989a, 1989b). Após este período, foram feitas algumas atualizações na classificação, como a proposta em 1995 por Bush, Jacoby e Medeiros (BUSH, JACOBY E MEDEIROS, 1995) e em 2001, novamente por Bush, que adaptou sua classificação anterior às formas de aquisição dos genes que codificam beta-lactamases (BUSH, 2001).

Em 2010, Bush e Jacoby propuseram uma atualização da classificação anterior, incluindo novos subgrupos (Quadro 1). A nova classificação foi baseada nas características funcionais da enzima, mantendo-se uma correlação com a classificação de Ambler, onde as enzimas foram divididas em três grupos (1, 2 e 3) e subdivididas de acordo com seu espectro de ação e inativação pelos inibidores de beta-lactamases, como a ácido clavulânico e ácido etilenodiamino tetra-acético

(EDTA). Além disso, para a caracterização adequada de novas beta-lactamases foram incluídas a análise de atributos como: substratos preferenciais, propriedades microbiológicas, perfis de inibição e sequência molecular dos genes que as codificam (BUSH; JACOBY, 2010).

**Quadro 1.** Esquema de classificação das beta-lactamases adaptado da tabela original de Bush e Jacoby, 2010.

Grupo Bush-Jacoby/2009	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros/1995	Classe Molecular Ambler	Características	Exemplos
1	1	C	Hidroliza melhor cefalosporinas que benzilpenicilinas; hidrolisa também as cefamicinas. Não são inibidas por AC ou TZB e EDTA.	AmpC, P99, CMY-2, FOX-1, MIR-1.
1e	NI		Aumento na hidrólise de ceftazidimas, e outros oximino-beta-lactâmicos. Não são inibidas pelo AC, TZB e EDTA.	CMY-37
2a	2a	A	Hidrolisa melhor benzilpenicilina que cefalosporinas. Inibidas por AC ou TZB.	PC1 TEM-1, TEM-2, SHV-1, TEM-90
2b	2b		Hidrolise similar das benzilpenicilinas e das cefalosporinas. Inibidas pelo AC ou TZB.	
2be	2be		Aumento na hidrólise oximino-beta-lactâmicos, tais como cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima e aztreonam. Inibidas por AC e TZB.	CTX-M-15, CTX-M-44 PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26, VEB-1.
2br	2br		Resistência à AC, sulbactam e TZB.	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26
2ber	NI		Aumento na hidrólise de oximino-beta-lactâmicos combinado com a resistência a AC, sulbactam e TZB.	TEM-50, TEM-68, TEM-89
2c	2c		Aumento na hidrólise de carbencilina. Inibidas pelo AC ou TZP.	PSE-1, CARB-3
2d	2d	D	Aumento na hidrólise de cloxacilina ou da oxacilina. Inibidas por AC.	OXA-1, OXA-10
2de	NI		Hidrólise cloxacilina ou oxacilina e oximino-beta-lactâmicos. Inibição variável pelo AC ou TZB.	OXA-11, OXA-15
2df	NI		Hidrólise cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos. Inibição variável pelo AC ou TZB.	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Hidrolisa cefalosporinas. inibidas pelo AC, mas não por aztreonam.	CepA
2f	2f		Enzimas que hidrolisam carbapenemas e possuem uma serina no seu sítio ativo. Tais enzimas são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	KPC-2, KPC-3, IMI-1, SME-1, GES-2
3a	3	B (B1) B (B3)	Hidrólise de beta-lactâmicos de amplo espectro, incluindo os carbapenêmicos, mas não os monobactâmicos. Inibidas pelo EDTA.	IMP-1, VIM-1, L1, NDM-1
3b	3	B (B2)	Hidrólise preferencial de carbapenemas. Inibidas pelo EDTA.	CphA, Sfh-1

**LEGENDA:** AC=Ácido clavulânico; TZP= Tazobactam; NI=Não incluso; EDTA= Ácido etilenodiamino tetra-acético; AmpC=Ampicilinase da classe C de Ambler; CARB=carbencilinase; CepA= cephalosporinase de classe A de Ambler; CMY=ativo frente à cephamycins; CphA=Carbapenemase isolada em Aeromonas hydrophila, CMY=ativo frente à cephamycins; CTX-M=cefotaximase isolada em Munich; FOX= ativo frente à cefloxitina, GES=Guiana-extended spectrum; IMI=β-lactamase que hidrolisa Imipenem; IMP=ativo frente à imipenem; KPC=K. pneumoniae carbapenemase; L1=Labile enzime Stenotrophomonas maltophilia; MIR=descoberto no Hospital Miriam; NDM=New Delli Metallo-β-lactamase; OXA=ativo frente à oxacilina; P99=isolado de Enterobacter cloacae amostra P99; PC1=isolado de Staphylococcus aureus amostra PC1;

PER=*Pseudomonas extended resistant*; PSE=*Pseudomonas specific enzyme*; Sfh=*Serratia fonticola carbapenem hydrolase*; SFO=também isolada de *Serratia fonticola*; SHV=*Sulphydryl reagent variable*; SME=*Serratia marcescens enzyme*; TEM=nome da paciente Temoneira; VEB=*Vietnam extended spectrum  $\beta$ -lactamase*; VIM= Verona integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase.

#### 2.5.1.1 *Beta-lactamases de Espectro Extendido (ESBLs)*

Estas enzimas pertencem à classe A de Ambler e, atualmente, representam o maior grupo de beta-lactamases estudadas (BRADFORD, 2001; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; GNIADKOWSKI, 2008). As ESBLs apresentam serina no seu sítio ativo e são codificadas por genes localizados em plasmídios. Geralmente, são inibidas pelos inibidores de beta-lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos monobactâmicos, podendo conferir também aos carbapenêmicos a baixos níveis (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008; WINOKUR et al, 2001, LIVERMORE, 2008; POIREL et al, 2007).

PER-1 foi a primeira ESBL descrita em *Acinetobacter spp.* na Europa e na Ásia (YONG et al, 2003; VAHABOGLU et al, 1997). No mesmo ano, outra ESBL, VEB-1, foi detectada pela primeira vez em *A. baumannii*. Essas amostras faziam parte de um único clone e foram responsáveis por um surto em um hospital em Valência, na Espanha (POIREL et al, 2003).

Após esse período, várias ESBLs foram descritas em *Acinetobacter spp.* como PER-2, isolada na Argentina (PASTERAN et al, 2006; CELENZA et al, 2006), VEB-1, na França (POIREL et al, 2003; NAAS et al, 2006), SHV-12 na China e nos Países Baixos (HUANG, Z.M. et al, 2004; NAIEMI et al, 2005), CTX-M-2 (NAGANO et al, 2003, 2004), VEB 1a na Argentina (PASTERÁN et al, 2006), TEM-92 na Itália (ENDIMIANI et al, 2007), SHV-5 em Nova Iorque (NAAS et al, 2007) e SCO-1 (POIREL et al, 2007). A variante VEB-3 foi relatada somente em amostras de *Acinetobacter spp.* provenientes de Taiwan (HUANG, L.Y. et al, 2008, 2010).

A primeira descrição da ESBL do grupo GES identificada em *A. baumannii* foi descrita na França e caracterizada como GES-11. Essa enzima além de conferir resistência aos beta-lactâmicos, incluindo o aztreonam, possui uma característica própria, em que substituições de aminoácidos em seu sítio ativo podem ampliar sua atividade hidrolítica, reduzindo a susceptibilidade antimicrobiana aos carbapenêmicos (MOUBARECK et al, 2009). No ano seguinte, ela foi novamente

descrita em isolados de *A. baumannii* na Bélgica, juntamente com GES-12 e uma nova variante GES-14 também descrita em 2011 na França (BOGAERTS et al, 2010; BONNIN et al, 2011a).

A produção de CTX-M-15 foi verificada em alguns isolados de *A. baumannii* na Índia e no Haiti (SHAKIL; KHAN, 2010; POTRON et al, 2011). Em 2011, foi descrita uma nova variante de ESBL, denominada PER-7, proveniente de um isolado de *A. baumannii* coletado de lavado brônquico de um paciente na França. Além desta ESBL, este isolado também produzia a oxacilinase OXA-23, que confere resistência aos carbapenemas e expressava o gene 16SRNA metilase *armA*, conferindo resistência a todos os aminoglicosídeos (BONNIN et al, 2011c).

A enzima *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) foi descrita pela primeira vez em 2001 nos Estados Unidos e, após sua descoberta, enterobactérias produtoras desta enzima foram descritas em diversas regiões do continente americano, europeu e asiático (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). Até pouco tempo, acreditava-se que a disseminação das enzimas do tipo KPC fosse restrita aos membros da família enterobacteriaceae. Entretanto, estas enzimas já foram detectadas em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de diversos países da América Latina (AKPAKA et al, 2009; WOLTER et al, 2009). Além disso, em março de 2010, foi relatado o primeiro caso de carbapenemase KPC em *Acinetobacter sp.*, em Porto Rico, que descreveu uma nova variante desta enzima denominada KPC-10 (ROBLEDO et al, 2010). Em 2011, o mesmo autor detectou a presença da enzima KPC em 14% dos isolados de *Acinetobacter baumannii* estudados, além de outras espécies, mostrando claramente a rápida disseminação do gene *Kpc* em importantes patógenos hospitalares em Porto Rico (ROBLEDO; AQUINO; VÁZQUES, 2011).

A emergência de micro-organismos produtores de ESBL é de grande importância clínica, pois este mecanismo é mediado por plasmídios, facilitando sua transmissão horizontal. A presença de cepas produtoras de ESBL acarreta implicações terapêuticas, pois a extensão do espectro de resistência para cefalosporinas de terceira e quarta geração limitam a utilização da maioria dos beta-lactâmicos, podendo aumentar a prescrição de carbapenêmicos (BUSH, 2001).

A detecção fenotípica laboratorial da ESBL apresenta dificuldades devido à presença de outros mecanismos que interferem nos testes de ESBL, como a presença de cefalosporinases, especialmente a enzima *AmpC*. Deste modo, a real

prevalência destas enzimas em *A. baumannii* é pouco conhecida (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

#### 2.5.1.2 *Metallo-beta-lactamases*

A produção de enzimas do tipo metalo-beta-lactamases (MβLs) é uma das principais causas de redução de sensibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos e têm sido descritas em isolados de *Acinetobacter* spp. desde o início da década de 90 (POIREL et al, 2000). Estas enzimas pertencem à classe B de Ambler e caracterizam-se por apresentarem um íon metálico no sítio ativo, geralmente o zinco ( $Zn^{2+}$ ), que participa da catálise (QUEENAN; BUSH, 2007). Essa classe de enzimas é inibida por agentes quelantes, como o EDTA ou ácido 2-mercaptopropiônico, mas não é afetada pelos inibidores convencionais de β-lactamases, como o ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (QUEENAN; BUSH, 2007). Além disso, essas enzimas possuem a capacidade de hidrolisar carbapenemas, bem como todos os outros antibióticos beta-lactâmicos, com a exceção do aztreonam (NORDMANN; POIREL, 2002).

As MBL são produzidas intrinsecamente por determinados micro-organismos, como *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium odoratum*, *Legionella gormanii*, *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia* (LIVERMORE; WOODFORD, 2000). Contudo, desde o início da década de 1990, novos genes que codificam MBLs têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, como *Pseudomonas* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae* (POIREL, 2000; RICCIO et al, 2000).

Estes genes são codificados por cassetes gênicos localizados no cromossomo ou plasmídio bacteriano, no entanto, com exceção da enzima SPM-1, que é codificada por um gene localizado em plasmídio, as demais MBL adquiridas são codificadas por genes localizados no integron de classe 1 (TOLEMAN et al, 2002). Quando esses genes se associam a elementos genéticos como plasmídios e transposons, estruturas genéticas que conferem mobilidade ao gene, são facilmente transferidas entre diferentes cepas da mesma espécie e ainda entre espécies distintas. Por esse motivo essas enzimas passaram a ser conhecidas como MBLs móveis ou adquiridas (SACHA et al, 2008).

Até o momento foram identificadas nove diferentes famílias de MBL adquiridas: IMP (imipenemase) (BUSH, 2001), VIM (Verona imipenemase) (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005), SPM (São Paulo metalo-beta-lactamase) (TOLEMAN et al, 2002), GIM (Germany imipenemase) (CASTANHEIRA et al, 2004), SIM (Seoul imipenemase) (LEE et al, 2005), AIM (Australian imipenemase) (YONG et al, 2007), DIM (Dutch imipenemase) (POIREL et al, 2010), KHM (Kyorin Hospital metalo-beta-lactamase) (SEKIGUSHI et al, 2008) e NDM-1 (New Dheli metalo-beta-lactamase) (YONG et al, 2009). Até o momento, essas novas famílias parecem restritas aos seus países, sendo que as famílias IMP e VIM são as mais comuns e estão disseminadas em vários países em cepas de *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter sp.* e enterobactérias (QUEENAN; BUSH, 2007).

O primeiro relato de uma MBL, a IMP-1, aconteceu em 1991, em um isolado clínico de *Serratia marcescens* no Japão, que apresentava resistência ao imipenem e cefalosporinas (WATANABE et al, 1991). Em 1999, oito anos depois, foi caracterizada a segunda MBL, denominada VIM-1, isolada em uma amostra de *P. aeruginosa* em Verona, na Itália (LAURETTI et al, 1999).

No Brasil, em 2003, foi descrita pela primeira vez, uma amostra de *A. baumannii* produtora de MBL do tipo IMP-1 proveniente de uma cultura de secreção traqueal de um paciente internado na UTI geral do Hospital São Paulo em 2000 (GALES et al, 2003). Desde então, a disseminação de isolados produtores de MBLs tem sido frequentemente descritas em hospitais brasileiros (LINCOPAN et al, 2005, 2006; SADER et al, 2005; TOGNIN et al, 2006).

Embora as MBLs não sejam as carbapenemases predominantes em *A. baumannii*, várias delas têm sido descritas: IMP-1, -2, -4, -5, -8 e -10, VIM-1, -2, -3, -4 e -11, SIM-1 e NDM-1 (CORNAGLIA; GIAMARELLOU; ROSSOLINI, 2011). As enzimas SPM-1, GIM-1 e AIM-1 foram identificadas apenas em *P. aeruginosa* no Brasil, na Alemanha e na Austrália, respectivamente. A MBL DIM-1 foi caracterizada a partir de uma *P. stutzeri* na Alemanha e a KHM-1 de *C. freundii* no Japão (SEKIGUSHI et al, 2008).

A enzima NDM-1 é uma das mais recentes MBL adquiridas e sua propensão à disseminação causa grande preocupação. Esta enzima foi detectada pela primeira vez em 2008, numa cepa de *K. pneumoniae* de um paciente que retornava para a Suécia a partir da Índia, onde NDM é comum em *Enterobacteriaceae* (CORNAGLIA; GIAMARELLOU; ROSSOLINI, 2011). Além desta propagação em

*Enterobacteriaceae*, isolados de *A. baumannii* produtores de NDM são cada vez mais identificados em todo o mundo (GÖTTIG et al, 2010).

Em 2010, ocorreu o primeiro relato da produção de NDM em *A. baumannii*, onde três isolados produziram a enzima NDM-1 juntamente com OXA-23 e *armA* (KARTHIKEYAN et al, 2010). No ano seguinte, a mesma foi relatada em *A. baumannii* na China (CHEN, Y. et al, 2011), Alemanha (PFEIFER et al, 2011), Argélia (BOULANGER et al, 2012), Bélgica (BOGAERTS, 2012), República Tcheca (HRABÁK et al, 2012; NEMEC; KRIZOVA, et al, 2012) e em Bangladesh (ISLAM et al, 2012). A variante NDM-2 foi detectada no Egito (KAASE et al, 2011], em Israel (ESPINAL et al, 2011) e nos Emirados Árabes (GHAZAWI et al, 2012).

#### 2.5.1.3 *Beta-lactamases do tipo AmpC*

As enzimas *AmpC*, pertencentes à classe C de Ambler, são enzimas cromossômicas que, geralmente, apresentam massa molecular de 34-40 kDa e ponto isoelétrico (pI) de aproximadamente 8.0 (PHILIPON; ARLET; JACOBY, 2002). Estas enzimas conferem resistência às penicilinas, inclusive às associações com inibidores de beta-lactamases (sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico), cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> gerações, e aos monobactâmicos (aztreonam) (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

Estudos apontam para o fato de que a presença deste grupo de enzimas em amostras de *Acinetobacter spp.* é alta, podendo alcançar até 82% (DANES et al., 2002). A resistência às oximino-cefalosporinas devido à produção desta enzima é também uma característica comum em *A. baumannii* (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

A síntese cromossomal desta enzima pode ser induzível em várias enterobactérias resistentes a antibióticos beta-lactâmicos, entretanto, em 2000, Bou e Martinez-Bentran, descreveram que os testes de indução com cefoxitina não induziram a produção de *AmpC*. Esses resultados mostraram que a enzima *AmpC* não é induzível em amostras de *Acinetobacter spp.* e, normalmente, é expressa em baixos níveis (BOU; MARTÍNEZ-BELTRÁN, 2000). O aumento da expressão do gene *AmpC* é regulado pela sequência promotora denominada IS*Aba1* (CORVEC et al, 2003, HERITIER; POIREL; NORDMANN, 2006; JACOBY, 2009). Esta sequência de inserção é um elemento genético bastante disseminado entre isolados de *A.*

*baumannii* e possui um sítio ativo promotor bastante eficiente para a produção de *Open reading frames* (ORFs) adjacentes (CORVEC et al, 2003; LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

A hiperexpressão de *AmpC* confere resistência à maioria das cefalosporinas de amplo espectro, entretanto cefepima e também os carbapenêmicos não são hidrolizados por esta enzima (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Diante da existência de variantes da beta-lactamase *AmpC* descritas em *Acinetobacter spp.*, Hujer e colaboradores (2005) propuseram a denominação uniforme de ADC (*Acinetobacter derived cephalosporinase*) para esta família de beta-lactamase (HUJER et al, 2005).

Em 2010, Rodriguez-Martinez e colaboradores descreveram, dentre as diversas variantes ADC relatadas, a primeira cefalosporinase de amplo espectro em um isolado de *A. baumannii*, nomeada de ADC-33 capaz de hidrolizar a ceftazidima, cefepima e aztreonam, enquanto praticamente não hidrolisavam os carbapenêmicos (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al, 2010). Recentemente, foi descrita uma nova cefalosporinase *AmpC* de espectro estendido, denominada ADC-56 (TIAN et al, 2011).

#### 2.5.1.4 Oxacilinases

As oxacilinases (OXA) são enzimas que pertencem à classe D de Ambler e apresentam o grupamento serina no seu sítio ativo, inativam principalmente os antimicrobianos carbapenêmicos e algumas cefalosporinas, como a cefepima; no entanto não há ação hidrolítica quando o substrato é a ceftazidima (BOU et al, 2000b; BROWN; AMYES, 2006; WALTER-HASMUSSEN; HOIBY, 2006). Uma característica marcante deste grupo de enzimas é o fato de serem fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, mas fortemente inibidas *in vitro*, pelo cloreto de sódio (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010).

Mais de 150 variantes distintas de enzimas da classe D já foram descritas, contudo apenas 45 destas exibem a capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico dos carbapenêmicos. Avaliando a identidade entre as sequências de aminoácidos das variantes das enzimas do tipo OXA, é possível identificar nove subgrupos. Até o momento, cinco desses subgrupos filogenéticos já foram descritos em *A. baumannii*,

OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like e OXA-143 (Tabela 2, Figura 1) (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010; HIGGINS et al, 2009).

Todos os subgrupos são relacionados com resistência aos carbapenêmicos adquirida, exceto o subgrupo OXA-51-like que é composto por enzimas intrínsecas em *A. baumannii*. Até o momento essa característica é utilizada para a identificação desta espécie bacteriana pela detecção da presença desses genes codificadores de enzimas pertencentes a esse subgrupo (HERITIER et al, 2005; QUEENAN; BUSH, 2007). Entretanto, como mencionado anteriormente, esta enzima foi detectada recentemente em isolados de *Acinetobacter* não *baumannii* (NEMEC et al, 2011).

As oxacilinasas com atividade carbapenemase são mais comuns em *A. baumannii* e representam um dos principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos nestas bactérias (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; ZAVASKI et al, 2010). A produção destas enzimas, quando associadas a outros mecanismos de resistência, como, por exemplo, alteração da permeabilidade da membrana externa, hiperexpressão de um sistema de efluxo ou alteração do sítio de ligação do antimicrobiano, pode resultar em alto grau de resistência aos carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007; LU et al, 2009; FEIZABALDI et al, 2008).

Assim como observado para as enzimas do tipo *AmpC*, a hiperexpressão de OXA-23-like, OXA-51-like ou OXA-58-like pode estar relacionada à presença de um elemento de inserção, geralmente *ISAbal1* adjacente ao gene codificador dessa enzima, que propiciam aumento da expressão destes genes e níveis mais elevados de resistência aos carbapenêmicos (NORDMANN; POIREL, 2002; TURTON et al, 2006b; RUIZ et al, 2007; DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). Associação semelhante foi descrita entre o gene *bla*<sub>OXA-51</sub> e *ISAbal9*, *bla*<sub>oxa-23</sub> e *ISAbal4* e entre *bla*<sub>oxa-58</sub> e *ISAbal3*. Nenhum elemento móvel foi associado até o momento ao gene *bla*<sub>oxa-40</sub>, pertencente ao grupo OXA-24-like (FIGUEIREDO, S. et al, 2009a, 2009b; BOGAERTS et al, 2008; POIREL; NORDMANN, 2006). A presença de transposase é um fator de mobilidade desses genes (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

A primeira cepa de *A.baumannii* portadora de serina beta-lactamase capaz de hidrolizar imipenem, foi isolada em 1985, na Escócia e apresentou resistência ao imipenem, às penicilinas e às cefalosporinas (PATON et al, 1993). Curiosamente, o imipenem não estava clinicamente disponível nesta época na Escócia (PATON et al, 1993). Inicialmente, a enzima foi denominada ARI-1 (*Acinetobacter resistant imipenem*), porém, no ano de 2000, foi realizada a análise da sequência genética

que mostrou 36% de identidade com a sequência de aminoácidos das enzimas OXA-5 e OXA-10. A enzima ARI-1 passou então a ser denominada de OXA-23 (DONALD et al, 2000). *A. baumannii* produtor da enzima OXA-23 tem-se disseminado rapidamente e surtos hospitalares têm sido descritos em vários países do mundo (MUGNIER et al, 2010).

Após a primeira publicação, foram descritos outros relatos que identificaram diferentes variantes desta família de enzimas em *A. baumannii*: OXA-24, -25, -66, -68 na Espanha, OXA-26 na Bélgica, OXA-27 em Singapura, OXA-40, -58, -75 e -76 na França, OXA-49 na China, OXA-64 e -71 na África do Sul, OXA-65, -75 a -78, -84, -86 a -89, -91, -92, -94, -95 e outros na Argentina, OXA-69 e -78 na Turquia, OXA-70 em Hong Kong e OXA-72 na Tailândia, -97 na Tunísia, entre outros (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006; QUEENAN; BUSH, 2007).

No Brasil, *A. baumannii* resistentes aos carbapenemas estão normalmente relacionados às oxacilinases OXA-23, com relatos de surtos desde o final da década de 90. A primeira descrição de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos foi em 2003, com oito isolados, relacionados a um surto, coletados de pacientes internados no Hospital das Clínicas e no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. Esses isolados eram produtores de OXA-23 e faziam parte de um mesmo clone, demonstrando a ocorrência da disseminação inter-hospitalar naquela cidade (DALLA-COSTA et al, 2003). O segundo relato foi descrito na literatura apenas em 2009, por nosso grupo de pesquisa, que descreveu a disseminação de clones multirresistentes de *A. baumannii* produtores do gene codificador da enzima OXA-23 na cidade do Rio de Janeiro. Dois clones foram prevalentes, sendo um deles disseminados em sete hospitais e o outro em cinco hospitais (CARVALHO et al, 2009). Neste mesmo ano, ocorreu o registro da transmissão e disseminação clonal de *A. baumannii* produtor desta enzima, entre profissionais de saúde, equipamentos médicos e pacientes em Porto Alegre (MARTINS et al, 2009).

Em 2010, Schimith-Bier e colaboradores avaliaram a persistência do primeiro clone de *A. baumannii* identificado na cidade de Curitiba. Neste estudo, foram avaliados isolados clínicos de *A. baumannii* onde foi detectada a presença de três clones distintos produtores da enzima OXA-23, sendo um deles genotipicamente semelhante ao primeiro clone identificado em 1999, que persistiu no mesmo hospital até abril de 2004. Os autores sugeriram que a transferência horizontal desse mecanismo de resistência estava codificada por um gene primordialmente

plasmidial, que desempenhou um papel importante na disseminação do mesmo (SCHIMITH-BIER et al, 2010). Outro estudo realizado em Porto alegre avaliou dados clínicos e epidemiológicos de infecções por *A. baumannii* multirresistentes, durante 12 meses, nos hospitais locais, onde através da PCR, onde 99% destes foi identificada a oxacilinase OXA-23 (MARTINS et al, 2011).

Em 2010, Girlich e colaboradores, demonstraram a presença do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> em um isolado de *A. baumannii* do ambiente (GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2010).

Em 2010, foi descrita a ocorrência da enzima OXA-72 de origem plasmidial em uma cepa de *A. baumannii* no Brasil e, no ano seguinte, ocorreu o primeiro relato da produção da enzima OXA-58 em isolados clínicos de pacientes internados em hospitais públicos na cidade do Rio de Janeiro (WERNECK et al, 2011b; FIGUEIREDO, D.Q. et al, 2011).

Recentemente, Higgins e colaboradores identificaram uma nova beta-lactamase com capacidade hidrolítica para carbapenêmicos, a OXA-143, também da classe D, que foi detectada em isolados de *A. baumannii* em hemoculturas de pacientes internados em UTI. Essa nova beta-lactamase possui 88% de similaridade com a OXA-40, 52% com a OXA-58 e 63% com a OXA-23, representando o primeiro membro de um novo subgrupo cuja prevalência até o momento permanece desconhecida (HIGGINS et al, 2009). Após esse primeiro relato, foram publicados dois trabalhos que mostraram divergência quanto à prevalência deste gene *bla*<sub>OXA-143</sub> nos hospitais brasileiros (ANTONIO et al, 2011; WERNECK et al, 2011a).

**Tabela 2.** Subgrupos de OXA-carbapenemases identificadas em *A.baumannii*\*

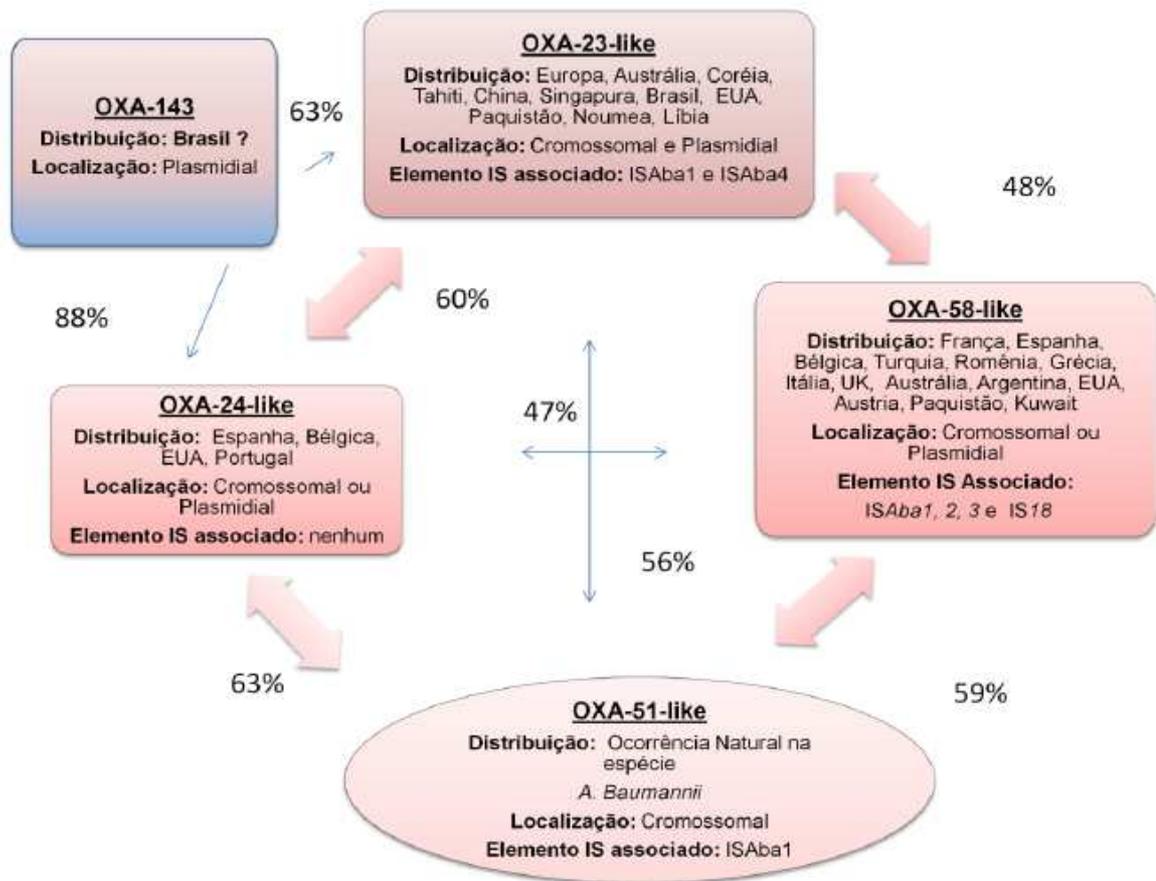
GRUPO	Subgrupo Filogenético	Componentes do Subgrupo	Localização	País de Origem
1	OXA-23	OXA-27, -49	Plasmidial e Cromossomal	Reino Unido Singapura e China
2	OXA-24	OXA-25, -26, -40 e -72	Cromossomal	Espanha, Bélgica, França e Tailândia
3	OXA-51	OXA-64 a -71, OXA-75 a -78, -84, -86 a -89, - 91, -92, -94 e -95 e outras	Cromossomal	Argentina
4	OXA-58	OXA-96, -97**	Plasmidial e Cromossomal	França, Singapura e Tunísia
5	OXA-143	Única	Plasmidial	Brasil***

\*Adaptado de POIREL; NORDMANN, 2006.

\*\*ZAVASCKI et al, 2010.

\*\*\*HIGGINS et al, 2009.

**Figura 1.** Resumo da distribuição e contexto genético das enzimas do tipo OXA em *A. baumannii*.\* As setas e as porcentagens correspondentes representam o grau de homologia de aminoácidos entre os diferentes grupos de enzimas. Os grupos dentro dos retângulos significam enzimas adquiridas em contraste com o grupo OXA-51-like dentro da elipse que é de ocorrência natural.



Fonte: \*Adaptado de PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008.

### 2.5.2 Alteração das proteínas ligadoras de penicilinas (PLPs)

Desde a descoberta das PLPs como alvo dos agentes beta-lactâmicos, o papel da resistência desse grupo de antimicrobianos tem sido objeto de estudo (ZAPUN; CONTRERAS-MARTEL; VERNET, 2008; CAYÔ et al, 2011). A inibição dessas proteínas produz um desequilíbrio na síntese da parede celular, resultando na inibição do crescimento ou lise osmótica celular (ZAPUN; CONTRERAS-MARTEL; VERNET, 2008).

A resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos devido à alteração de PLPs é mais comum em microrganismos Gram positivos em relação aos Gram negativos. Entretanto, a resistência aos carbapenêmicos observada em *A. baumannii* é explicada pela redução da expressão de PBP-2, como descrito em amostras isoladas em Sevilha, Espanha (FERNANDEZ-CUENCA et al, 2003; CAYÔ et al, 2011).

### 2.5.3 Diminuição da expressão de porinas (OMPs)

As bactérias Gram negativas apresentam em torno do seu peptidoglicano uma membrana externa, que atua como uma barreira permeável que elimina as substâncias nocivas às células, permitindo ao mesmo tempo, influxo das moléculas de nutrientes. Essa membrana externa contém proteínas transmembranares (OMPs- “*outer membrane proteins*”) denominadas porinas.

Porinas são proteínas capazes de formar canais hidrofílicos que permitem o transporte de moléculas através de membranas de bicamada lipídica e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana. A perda ou diminuição da expressão destes canais podem conferir às bactérias diferentes níveis de resistência a certos antimicrobianos (VILA; MARTI; SANCHES-CESPEDES, 2007; ZAVASCKY et al, 2010).

A principal OMP de *A. baumannii* é uma proteína monomérica e foi nomeada OmpAb ou HMP- AB (“*Heat-modifiable protein*”) e pertence à família OmpA-like (JYOTHISRRI; DEEPAK; RAJESWARI, 1999; GRIBUN et al, 2003).

A resistência aos carbapenemas em *A. baumannii* está associada a perda de uma OMP de 29KDa, denominada CarO. Essa OMP foi detectada em isolados clínicos de *A. baumannii* onde não foi observada nenhuma atividade enzimática de carbapenemas. Ela demonstrou estar associada à resistência ao imipenem, porém, parece possuir um canal monomérico inespecífico para esta droga. (SIROY et al, 2005; MUSSI; LIMANSKY; VIALE, 2005; MUSSI; RELING; LIMANSKY, 2007; LEE, Y. et al, 2011; CATEL-FERREIRA et al, 2011). Outras duas porinas podem facilitar a difusão dos carbapenemas através da membrana externa em *A.baumannii*, a Omp33-36 kDa (TOMAS DEL MARE et al, 2005) e a porina OprD de 43 kDa (DUPONT et al, 2005; LUO et al, 2011).

#### 2.5.4 Hiperexpressão de bomba de efluxo

As bombas de efluxo exemplificam um fenômeno único de resistência à drogas através de um simples mecanismo que causa resistência contra diferentes classes de antibióticos. Em bactérias Gram negativas, estes sistemas são formados pela associação, geralmente, de três subunidades: bomba (na membrana interna, que exerce a atividade de expelir substâncias), canal de saída (porina, na membrana externa) e uma proteína ligadora (ligando a bomba a porina) (KUMAR; SCHWEIZER, 2005; POOLE et al, 2007).

Até o momento já foram descritas seis famílias de sistemas de efluxo: MF (facilitador maior), ABC (cassete ligação a ATP), SMR (pequena multirresistência), RND (resistência, nodulação e divisão), MATE (efluxo de multidrogas e moléculas tóxicas) e DMT (transportador droga/metabólito) que estão distribuídas tanto em bactérias Gram negativas, quanto em Gram positivas (POOLE et al, 2002). Onze sistemas de efluxo já foram descritos em *Acinetobacter sp*: AdeABC, AdeIJK, Tet(A), Tet(B), AbeM, AdeDE, AdeXYZ, CraA, AmvA, AbeS e AdeFGH (COYNE; COURVALIN; PÉRICHON, 2011).

O sistema de efluxo AdeABC foi o primeiro descrito em *A. baumannii* é o mais conhecido e bastante estudado. Esse complexo pertencente à família RND e confere resistência a aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, tigeciclina, macrólidos, cloranfenicol e trimetoprima (MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001; DAMIER-PIOLLE et al, 2008).

## 2.6 IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL DE BETA-LACTAMASES

### 2.6.1 Testes fenotípicos

Os métodos de disco aproximação com ácido mercaptopropiônico e epsilométrico (E-test) para metalo-beta-lactamase (MBL) (ABBIODISK) têm sido os mais utilizados para detecção de MBL (ARAKAWA et al, 2000; WALSH et al, 2002). Ambos são baseados na capacidade dos agentes quelantes metálicos de inibir a ação enzimática, permitindo assim, que o antimicrobiano exerça sua atividade. Apesar de serem simples na realização e mais baratos que os métodos genotípicos, eles têm mostrado resultados discordantes e apresentam limitações importantes.

Isso ocorre pois, como existem muitas variantes de MBL, os resultados dos testes dependem da capacidade hidrolítica da enzima que está presente, podendo levar a falhas na interpretação (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; MARTINS et al, 2007).

O teste de Hodge Modificado é um teste fenotípico utilizado para *screening* da atividade de carbapenemases, não especificamente das enzimas do tipo MBL, sendo que outras enzimas, como as oxacilinas e as do grupo A de Ambler, são também passíveis de detecção por esse ensaio (LEE, K et al, 2003). Inicialmente, esse teste foi recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para confirmação da suspeita de bactérias produtoras de enzimas carbapenemase em espécies de *Enterobacterales*. Por ser de fácil realização, pode ser aplicado na rotina de laboratórios de microbiologia, entretanto, como já demonstrado em alguns trabalhos isolados ocasionais podem apresentar resultados falso-negativos (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; CARVALHAES et al., 2010, LEE, K. et al, 2011).

#### 2.6.2 Reação em cadeia da polimerase para detecção de Beta-lactamases

A amplificação do DNA realizada através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utiliza iniciadores (primers) selecionados de modo a amplificar regiões selecionadas do genoma. A técnica de PCR permite a detecção de genes específicos responsáveis pela produção das MBLs e das OXAs (WOODFORD et al, 2006; TOGNIN et al, 2006; KOH et al, 2007; MARTINS et al, 2007).

## 2.7 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ASSOCIADOS A OUTROS ANTIMICROBIANOS

### 2.7.1 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos, muitas vezes em combinação com beta-lactâmicos de largo espectro, têm sido utilizados para tratar infecções bacterianas por bactérias Gram negativas. Eles se ligam especificamente ao rRNA 16S nas subunidades ribossômicas 30S inibindo a síntese de proteínas. Um dos principais mecanismos de resistência a essas drogas são as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (acetiltransferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases) denominadas

aminoglicosidasas, que atuam diminuindo a sua afinidade de ligação às unidades ribossômicas do RNA das bactérias (ZAVASCKI et al, 2010). Essas enzimas são codificadas por genes que estão associados aos integrons de classe 1 (NEMEC et al, 2004; DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). Além disso, a expressão de bombas de efluxo e mais recentemente a metilação da região 16S rRNA também foram associados à resistência para estes compostos (VILA; MARTÍ; SÁNCHEZ-CÉSPEDES et al, 2007). A metilação desta região difere da resistência por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos por conferir uma resistência de alto nível a todos os aminoglicosídeos (DOI et al, 2007).

A 16S rRNA metilase *armA* já foi detectada em *A. baumannii* na Coreia, China, América do Norte, Noruega e Bulgária (LEE, H. et al, 2006; CHO et al, 2009; ZHOU, Y. et al, 2010; DOI et al, 2007; KARAH et al, 2011; STRATEVA et al, 2011). Na Índia, foi detectada pela primeira vez a coexistência do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> com o gene *bla*<sub>NDM-1</sub> e *armA* em isolados clínicos de *A. baumannii* (KARTHIKEYAN; THIRUNARAYAN; KRISHNAN, 2010) e recentemente, Brigante e colaboradores relataram a emergência e disseminação de um clone multirresistente de *A. baumannii* produtor da carbapenemase OXA-23 e da 16S rRNA metilase *armA* na Itália (BRIGANTE et al, 2012).

### 2.7.2 Fluoroquinolonas

Até 1990, as quinolonas apresentaram atividade razoavelmente boa frente a *Acinetobacter*, mas a resistência a esses antibióticos emergiu subsequentemente de forma rápida em isolados clínicos (TOWNER et al, 2009). Os mecanismos de resistência às fluoroquinolonas podem ser por alteração na estrutura das subunidades da DNA girase, geralmente por mutação em *gyrA* e/ou *parC*; por redução da permeabilidade da membrana externa ou por aumento do efluxo da célula. Uma substituição em um códon no gene *gyrA* está associada a resistência moderada as quinolonas, enquanto duas substituições nos genes *gyrA* e *parC* conferem resistência elevada (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; TOWNER, 1997).

### 2.7.3 Tetraciclina

As tetraciclina são antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese de proteínas ligando-se aos ribossomos e impedem que o RNA-transportador (RNAt) se fixe no ribossomo e, deste modo, a síntese protéica é inibida (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

A tigeciclina é representante de uma nova classe de antibióticos, a glicilglicina, relacionada com tetraciclina e até o momento demonstrou ter boa atividade “in vitro” contra *A. baumannii*. A análise realizada por Ruzin e colaboradores mostrou que a tigeciclina não é afetada pelos sistemas específicos que atuam sobre as tetraciclina (RUZIN; KEENEY; BRADFORD, 2007), entretanto, atualmente já existem diversos relatos de resistência à tigeciclina em *A. baumannii* (CHANG, K.C. et al, 2012; TANEJA et al, 2011; AL-SWEIH; AL-HUBAIL; ROTIMI, 2011).

### 2.7.4 Polimixina

Polimixinas são antimicrobianos peptídicos com atuação na membrana externa e citoplasmática conduzindo à perda da integridade da membrana. Dentre elas, a polimixina B e polimixina E (colistina-COL) são adequadas para uso clínico (ZAVASKI et al, 2007). Por um longo período, as polimixinas foram pouco utilizadas devido a preocupações de toxicidade renal e pela pouca disponibilidade no mercado nacional. No entanto, nos últimos 5 anos o surgimento de bactérias Gram negativas multirresistentes e a falta de novos antimicrobianos têm levado a sua reutilização, especialmente COL, que têm sido cada vez mais utilizada como o "último recurso" no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* multirresistentes (MICHALOPOULOS; FALAGAS, 2008).

Assim, o uso clínico de polimixinas contra isolados de *A. baumannii* tem sido demonstrado em alguns estudos. No ano de 2007, em um estudo retrospectivo, Kallel e colaboradores observaram 75% de cura em pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) causada por isolados de *A. baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* pandrug-resistente (PDR), suscetível apenas a COL (KALLEL et al, 2007). Em 2010, Falagas e colaboradores, em uma análise de coorte retrospectivo, relataram uma taxa de 87% de cura em doentes que receberam COL intravenosa

(FALAGAS et al, 2010). Resultados semelhantes também foram relatados por outros autores (LEVIN et al, 1999; MICHALOPOULOS et al, 2005; HOLLOWAY et al, 2006).

Em 2006, Gales e colaboradores verificaram taxas resistências à polimixina B de 2,7% e 1,7%, em isolados de *A.baumannii* coletados na Europa e no Norte e América Latina, respectivamente (GALES; JONES; SADER, 2006). Ainda em 2006, Souli e colaboradores verificaram 3% de resistência a COL em cepas *A. baumannii* provenientes de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva na Grécia (SOULI et al, 2006). Posteriormente em 2007, Ko e colaboradores relatam taxas de resistência mais altas (27,9%) entre isolados de *A. baumannii* coletados de dois hospitais sul-coreanos (KO et al, 2007). Young Kyoung Park e colaboradores relataram a emergência de *extreme drug resistance* (XDR) em *A. baumannii* isolados de pacientes em UTIs na Coreia, verificando a resistência desses isolados a todos os antimicrobianos testados, inclusive à polimixina e colistina (PARK et al, 2009a). Neste mesmo ano, também na Coreia, foram identificados dois clones distintos principais de *A. baumannii* resistente a carbapenemas (CRAb), um deles correspondente a 56,3% dos isolados, apresentou alta resistência a polimixina e colistina com taxas de 33,3% e 37% (PARK et al, 2009b). No Kwait, dentre 250 isolados de *Acinetobacter* coletados de 8 hospitais do governo por 6 meses, 13.6% e 12% foram resistentes a tigeciclina e colistina (AL-SWEIH et al, 2011).

## 2.8 ESTRUTURAS DE DNA QUE DISSEMINAM RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

### 2.8.1 Integrons

Integrons são elementos genéticos de DNA que levam à disseminação de genes de resistência a antibióticos entre diferentes espécies bacterianas. Além disso, são capazes de promover a aquisição e expressão de genes incorporados dentro de cassetes de genes (STOKES; HALL, 1989). Do ponto de vista funcional, a definição de integron é baseada numa plataforma funcional onde os componentes essenciais são encontrados em um segmento conservado situado na extremidade 5'CS, composta por três elementos fundamentais: o gene *intl*, que codifica uma enzima denominada integrase, um sítio de recombinação específico *attI* e um promotor, PC (NUNES DUBY et al, 1998; HALL; COLLIS, 1995; BOUCHER et al,

2007). A integrase catalisa a recombinação entre o sítio *attI* e um segundo sítio chamado *attC* ou elemento de 59 bases. O sítio *attC* é normalmente associado a uma ORF (“*Open reading frame*”) de fita simples circular, formando uma estrutura chamada cassete gênico (CG). Os CGs são elementos móveis não replicativos, que podem ser integrados ou retirados da plataforma funcional por um mecanismo de recombinação sítio-específico catalisado pela integrase *intI*. Muitos dos genes de resistência a antibióticos encontrados em microrganismos Gram negativos constituem cassetes de genes inseridos em um integron (RECCHIA; HALL, 1995).

Cinco classes de integrons foram identificadas, podendo ser distinguidas pelas seqüências de aminoácidos de suas respectivas proteínas integrase (CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010). As classes 1, 2 e 3 são as mais comumente detectadas e as classes 4 e 5 foram detectadas apenas uma vez (HOCHHUT et al, 2001).

Integrons de classe 1 constituem grande parte dos integrons encontrados em amostras bacterianas obtidas de espécimes clínicos e podem estar associados à aquisição e mobilização de genes de resistência a antibióticos (PETERS, et al. 2001). Esta classe de integrons móveis é responsável por conferir resistência a alguns antibióticos beta-lactâmicos, aos aminoglicosídeos, trimetoprima, rifamicina, eritromicina, estreptotricina, cloranfenicol, fosfomicina, quinolonas e a antissépticos. Em alguns trabalhos, foram identificados integrons de classe 1, que foram cruciais para altos níveis de resistência aos carbapenemas, particularmente MBLs como, por exemplo; *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>DIM-1</sub> (WALSH et al, 2005.; YONG et al, 2009; ZHAO et al, 2009; POIREL et al, 2010). O integron de classe 1 também contribuiu para a disseminação de genes de resistência a antibióticos em isolados clínicos não relacionados, no Brasil, onde foi detectado por transportar o gene *bla*<sub>IMP-1</sub> e um novo gene de resistência à aminoglicósídeo (MENDES et al, 2007).

Integron de classe 2 foi descrito em amostras de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes isoladas na França, Grécia e República Tcheca, entre os anos de 1992 e 1998, apresentando, particularmente, resistência a aminoglicosídeos, sulfonamidas, cloranfenicol e beta-lactâmicos (PLOY et al, 2000).

Em 2010, um novo integron de classe 2 foi identificado em *A. baumannii* composto por sete determinantes de resistência, incluindo *bla*<sub>CARB-4</sub>, e esta foi a primeira vez em que um gene codificador de beta-lactamase foi identificado em um integron de classe 2 (RAMÍREZ; PIÑERO; CENTRÓN, 2010). Dois anos mais tarde,

os mesmos autores relataram a disseminação de integrons de classe 2 entre isolados de *A.baumannii* multirresistentes (MDR), com persistência de dois novos clones na Argentina e no Chile. Os autores chamaram atenção para a falta de informação na América do Sul e a necessidade de vigilância molecular contínua (RAMÍREZ et al, 2012). No Brasil, este integron foi descrito recentemente em isolados de *A. baumannii* MDR circulando em duas regiões geográficas distintas (FONSECA et al, 2011).

Integron de classe 3 foi descrito em uma amostra de *Serratia marcescens* isolada no Japão em 1995 (SENDA et al, 1996). Integrons de classe 4 e 5 foram encontrados no genoma de *Vibrio cholerae* e sua associação com resistência aos antimicrobianos é desconhecida (MAZEL et al; 1998). A transferência horizontal de genes de resistência entre amostras bacterianas pode ocorrer pela disseminação de transposons contendo integrons, e pela movimentação de plasmídeos conjugativos contendo integrons (STOKES; HALL, 1989). A caracterização de integrons tem sido pesquisada por vários autores no intuito de determinar o papel destes integrons na disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos no ambiente hospitalar (LÉVESQUE et al; 1995).

### 2.8.2 Sequência de Inserção (SI)

As sequências de inserção são os menores e mais abundantes elementos de transposição presentes no genoma bacteriano capazes de realizar transposição independente, causando assim mutações de inserção e rearranjos no genoma (MUGNIER et al, 2009). Sua ação no aumento da resistência consiste no fato de poderem conter regiões promotoras que aumentam a expressão de genes de resistência localizados posteriormente no genoma (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Diversas sequências de inserção tem sido descritas em *Acinetobacter*, cada uma associada com genes específicos e denominadas IS*Aba*, sendo IS*Aba*1, IS*Aba*2, IS*Aba*3 e IS*Aba*4 as mais conhecidas.

Curiosamente, IS*Aba*1 parece estar exclusivamente relacionada com a espécie *A. baumannii* e foi detectada em 80% dos 50 isolados que foram coletados de 20 países em todo o mundo (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; MUGNIER et al, 2009). As carbapenemases do tipo OXA pertencentes aos grupos OXA-23, OXA-51 e OXA-58 frequentemente possuem associação a esses elementos de inserção.

ISAb<sub>a1</sub>, ISAb<sub>a2</sub>, ISAb<sub>a3</sub>, ISAb<sub>a4</sub>, ISAb<sub>a10</sub>, ISAb<sub>a125</sub>, ISAb<sub>a825</sub> e IS18 já foram encontradas adjacentes ao grupo OXA-23 ou OXA-58 em isolados clínicos de *A. baumannii* (CORVEC et al, 2007; BERTINI et al, 2007; BOGAERTS et al, 2008; GIANNOULI et al, 2009; EVANS et al, 2010; LEE, Y. et al, 2011; RAVASI et al, 2011). Já o grupo OXA-51 possui associação com ISAb<sub>a1</sub> e ISAb<sub>a9</sub>. Esta variedade de sequências contribui tanto para a resistência antimicrobiana, quanto para o aumento da plasticidade genômica (FIGUEIREDO, S. et al, 2009b).

A sequência ISAb<sub>a1</sub> já foi encontrada associada a outros genes de resistência, como *bla*<sub>AmpC</sub> e *bla*<sub>SulI</sub> nas espécies de *Acinetobacter* em que já foi descrito. A super expressão do gene intrínseco da cefalosporinase *AmpC* e *bla*<sub>OXA-51</sub>, ocorre devido à inserção adjacente da sequência de inserção ISAb<sub>a1</sub>, que é uma promotora para sua expressão eficiente (CORVEC et al., 2003; TURTON et al, 2006b). Normalmente estão presentes em múltiplas cópias ao longo do genoma, onde em conjunto podem atuar simultaneamente em vários genes alvo (HÉRITIER; POIREL; NORDMANN, 2006).

Vale lembrar, que ISAb<sub>a1</sub> pode provocar a mobilização de genes e por sua vez, alojar o determinante no plasmídeo, tornando o gene resistente transferível. O gene *bla*<sub>OXA-23</sub> silencioso, carregado no cromossomo do *A. radioresistens* provou ser a fonte do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> codificado pelo plasmídeo em *A. baumannii* (POIREL et al., 2008). O gene *bla*<sub>OXA-51-like</sub> (*bla*<sub>OXA-138</sub>) mediado por plasmídeo e com ISAb<sub>a1</sub> adjacente, foi identificado em um isolado clínico de *A. nosocomialis*, enquanto que tal gene intrínseco *bla*<sub>OXA-51</sub> foi previamente encontrado apenas em *A. baumannii*. Ao analisar a plataforma genética, a fonte original do gene *bla*<sub>OXA-51-like</sub> foi confirmada como sendo *A. baumannii* (LEE, Y. et al, 2009).

## 2.9 MÉTODOS DE TIPAGEM MOLECULAR

Para controlar a propagação do *A. baumannii* nos hospitais, é necessário identificar os potenciais reservatórios do organismo e seus modos de transmissão. Os métodos de tipagem molecular são necessários para avaliar se as cepas de *Acinetobacter* são epidemiologicamente relacionadas ou não. Em geral, cepas com 100% de similaridade genética são consideradas indistinguíveis, enquanto que as cepas com mais de 80% de similaridade genética são consideradas relacionadas e

as com menos que 80% são consideradas distintas (SINGH et al, 2006; SADER et al, 1993; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

As metodologias de tipagem molecular se baseiam em diferenças na sequência ou na organização do DNA genômico para realização de discriminação entre as cepas e tem sido as mais utilizadas atualmente.

Os sistemas de tipagem molecular, incluem perfil plasmídial; ribotipagem; PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*); análise de RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*); REP-PCR (*repetitive extragenic palindromic*); análise de AFLP; PCR do gene integrase; infrequent-restriction-site PCR, e mais recentemente, MLST e multilocos PCR-ESI-MS (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). As técnicas moleculares frequentemente usadas em laboratórios para tipagem epidemiológica e estudos de genética de população em *Acinetobacter* são PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado) e MLST (tipagem baseada em seqüenciamento de multi-locos).

Karah e colaboradores investigaram a epidemiologia molecular e resistência antimicrobiana de 11 CRAb da Noruega no período de 5 anos através do MLST, multiplex PCR, tipagem do gene *bla*<sub>OXA-51</sub> e PFGE (KARAH et al, 2011). Na Grécia, a fim de analisar a evolução e relação genética de linhagens clonais de *A. baumannii* coletados em 8 hospitais terciários durante 10 anos, 94 isolados foram selecionados aleatoriamente, pesquisados para genes de carbapenemases e então tipados por PFGE, tri-locus sequence typing e MLST (GOGOU et al, 2011). Outros trabalhos também utilizaram a tipagem por PFGE e MLST em diversos países como Estados Unidos, Austrália, Espanha e Itália (ADAMS-HADUCH et al, 2011; RUNNEGAR et al, 2010; VILLALÓN et al, 2011; MAMMINA et al, 2012, ZARRILLI et al, 2012).

### 2.9.1 Análise Plasmidial

A maioria das espécies de *Acinetobacter* contém plasmídeos. A análise do plasmídeo foi usado com sucesso para tipagem epidemiológica de cepas de *A. baumannii* (SEIFERT et al, 1994b; NEMEC et al, 1999), sendo o perfil de plasmidial um dos poucos métodos que também têm sido aplicado para estudar a epidemiologia de espécies de *Acinetobacter* não pertencentes ao grupo *A. baumannii* (SEIFERT et al, 1994a; 1997). Neste método, a interpretação dos resultados deve levar em consideração que muitos plasmídeos são facilmente transferíveis, podendo ser adquiridos ou perdidos, e isso contribuiu para que este

método molecular fosse substituído por outros mais robustos para estudos epidemiológicos de *Acinetobacter* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

### 2.9.2 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A metodologia de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é provavelmente a técnica de DNA *fingerprinting* mais utilizada para tipagem de uma variedade de bactérias. Ela consiste no aprisionamento do DNA total das cepas em blocos de agarose, seguido pela digestão com enzimas de restrição. A separação dos fragmentos é realizada em eletroforese de campo pulsado, onde campos elétricos alternados são aplicados.

Esta técnica foi introduzida por Scharz e colaboradores no ano de 1993, e atualmente, mesmo diante de diversos métodos disponíveis, permanece como método de referência de escolha para tipagem do DNA em *Acinetobacter* por sua reprodutibilidade e poder discriminatório, sendo considerada como o padrão-ouro (SCHARTZ; CANTOR, 1984; SINGH et al, 2006). Ela auxilia na investigação epidemiológica dos surtos como também para definir a relação genética entre isolados provenientes de diferentes cidades e países, pois estabelece o grau de similaridade entre diferentes isolados clínicos demonstrando se são altamente relacionados ou indistinguíveis, sugerindo a transmissão a partir de uma fonte comum ou entre pacientes (SCHARTZ; CANTOR, 1984; NEMEC et al, 2008; VAN DEN BROEK et al, 2006; COELHO et al, 2006; LANDMAN et al, 2009).

Em *Acinetobacter*, a digestão do DNA cromossômico é feita com as endonucleases de restrição *Apal* e / ou *SmaI* (CARVALHO et al 2009, TOWNER et al, 2008; LAMBIASE et al, 2012; SHAHCHERAGHI et al, 2011; LEE, Y. et al, 2010).

A análise do perfil das bandas geradas na eletroforese é realizada pela aquisição da imagem com posterior comparação dos perfis obtidos em “softwares” especializados, que permitem a análise de um grande número de isolados e armazenagem em um banco de dados para análises posteriores (TENOVER et al, 1995; REMENTERIA et al, 2001). Esses “softwares” fornecem uma representação visual da similaridade entre os isolados e a relação genética entre os grupos clonais através da construção de um dendograma (SINGH et al, 2006).

### 2.9.3 Métodos de tipagem molecular baseados em PCR

Diversos métodos de tipagem usando PCR têm sido aplicados com sucesso em estudos epidemiológicos. Esses métodos permitem a tipagem de um elevado número de isolados de um modo simples, rápido e de baixo custo, pois não requerem equipamentos sofisticados. Em *A. baumannii* têm sido utilizados em estudos epidemiológicos para definir a relação genética entre os isolados. No entanto, nem todos os métodos são igualmente eficazes, diferindo, no poder discriminatório e na diferenciação dos vários níveis taxonômicos (SINGH et al, 2006).

Dentre os métodos baseados em PCR, o ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), AP-PCR (*Arbitrarily Primed*) e REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*) têm sido os mais utilizados para tipagem em *Acinetobacter sp.* (SINGH et al, 2006; GRUNDMANN et al, 1995,1997).

A REP-PCR utiliza sequências oligonucleotídicas iniciadoras complementares de sequências de DNA repetitivas muito conservadas e presentes em numerosas cópias no genoma da maioria das bactérias (BOU G. et al, 2000a; SNELLING et al, 1996). Esta técnica tem sido utilizada como uma alternativa para a tipagem de *A. baumannii* (FONTANA et al, 2008).

As técnicas de RAPD (*Randomly Amplified Polimorphic DNA*) e AP-PCR se inserem na categoria de PCR baseados em marcadores que utilizam iniciadores arbitrários. RAPD utiliza apenas um único *primer* ao invés de um par e foi utilizada com sucesso para avaliar o parentesco das cepas em isolados de *Acinetobacter* (GRASER et al, 1993). Na AP-PCR são utilizadas baixas temperaturas de anelamento (pelo menos inicialmente) durante a amplificação, permitindo hibridizações imperfeitas em várias posições cromossômicas aleatórias para ocorrer e iniciar a síntese de DNA (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Durante a investigação de um surto em Madri, Bou e colaboradores compararam os resultados do AP-PCR, REP-PCR e PFGE na definição da relação genética entre isolados obtidos antes, durante e após o surto. Os autores constataram a presença de 8 diferentes grupos de REP-PCR e PFGE e somente 7 grupos por AP-PCR. Assim, REP-PCR e PFGE mostraram-se mais discriminatórios que AP-PCR (BOU, G. et al, 2000a).

#### 2.9.4 Outros Métodos de Tipagem Molecular

Outros métodos como ribotipagem, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), MLST (Multi Locus Sequence Typing) e VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) também têm sido utilizados para tipagem molecular de *Acinetobacter sp.* (SINGH et al, 2006; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

A ribotipagem ou análise do padrão de restrição de RNA ribossomal utiliza as enzimas *EcoRI*, *Clal*, e *Sall* para a restrição do DNA cromossômico, seguido por eletroforese, *blotting* e hibridação. Foi desenvolvida principalmente para identificar *Acinetobacter*, em cepas particulares do complexo *A. calcoaceticus-A. baumannii* ao nível de espécie e também para tipagem de cepas em estudos epidemiológicos (GERNER-SMIDT, 1992; NEMEC; DIJKSHOORN; VAN DER REIJDEN, 2004). No entanto, seu poder discriminatório é limitado, e outros métodos são menos trabalhosos e mais discriminatórios (SEIFERT; GERNER-SMIDT, 1995; SILBERT et al, 2004). Landman e colaboradores realizaram um estudo onde compararam a ribotipagem com PFGE, MLST e REP-PCR na tipagem de cepas endêmicas de *A. baumannii* em Nova Iorque e observaram que a técnica com menor poder discriminatório entre as testadas foi a ribotipagem (LANDMANN et al, 2009).

A análise de AFLP (*Amplification of Fragment Length Polymorphisms*), estabelecida na década de 1990, é um método de tipagem de DNA que utiliza a combinação da digestão com enzimas de restrição e PCR. Neste procedimento, o DNA é digerido com duas endonucleases de restrição diferentes (corte raro e corte frequente), gerando fragmentos de diferentes tamanhos. A metodologia de AFLP tem elevado poder discriminatório e alta reprodutibilidade, entretanto é considerada bastante laboriosa, necessita de profissionais altamente especializados para realização da técnica, além de gerar padrões de bandas complexos (entre 30-50), sendo a análise dependente de *softwares* especializados e caros (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

MLST (*Multilocus Sequence typing*) é um método de tipagem altamente discriminatório que tem sido aplicado a uma variedade de patógenos bacterianos, tais como *Neisseria meningitidis* (MAIDEN et al, 1998), *Streptococcus pneumoniae* (FEIL et al, 2000) e *S. aureus* (ENRIGHT et al, 2000). Atualmente, MLST é um dos poucos sistemas de biblioteca de tipagem utilizados para estudos epidemiológicos de *A. baumannii*.

Esta metodologia se baseia na amplificação de sete genes conservados do genoma, seguido de sequenciamento. Para *A. baumannii* existem dois esquemas distintos de análise do MLST, que foram chamados de MLST-OD (relacionado ao banco de dados Oxford) e MLST-IP (desenvolvido pelo Instituto Pasteur). Pelo esquema de MLST-OD, os sete genes conservados (*housekeeping*) usados são *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* e *rpoD* e pelo esquema do MLST-IP os sete genes usados são *gltA*, *recA*, *cpn60*, *fusA*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB* (BARTUAL et al, 2005; NEMEC et al, 2008). Cada um dos genes é sequenciado e a sequência obtida é comparada com as já existentes nos bancos de dados. Para cada sequência diferente de cada gene, é dado um número de alelo único (*allele number*). O número de alelo é fornecido para cada um dos sete genes. Assim, a combinação de todos os números de alelos gera o ST (*sequence type*), que pode ser comparado com os STs já descritos no banco de dados disponível no site <http://www.pubmlst.org/a.baumannii> (MLST-OD) e <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/abaumannii.html>(MLST-IP).

Assim, o MLST tem sido bastante utilizado, mostrando-se ser muito mais específico quando comparado ao PFGE, RAPD, REP-PCR onde o polimorfismo genético pode dificultar a determinação do genótipo. Outra vantagem desse método é a facilidade de comparação inter-laboratorial. Como esta técnica gera sequências de DNA e não padrões de bandas, os resultados podem ser comparados em qualquer lugar do mundo, sem que haja critérios interpretativos envolvidos. Dessa forma, esta metodologia se apresenta mais adequada para investigações epidemiológicas de longos períodos e de cepas não relacionadas geograficamente (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

## 2.10 FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE EM *A. baumannii*.

Existem diversos fatores de virulência que podem ter papel importante na patogênese das infecções causadas por *A. baumannii* e tem sido alvo de investigações recentes. Entre esses fatores destacam-se a produção de enzimas extracelulares com atividades lipolíticas e citolíticas, proteínas da membrana externa (AbOmpA), moléculas de adesão (fimbria e AbOmpA) que funcionam durante a ligação às células epiteliais, formação de biofilme em superfícies bióticas e

abióticas, sideróforos (acinetobactina) e detecção de *quorum sensing*. Em nosso estudo, abordamos alguns desses fatores, descritos abaixo.

### 2.10.1 Aderência e biofilme

Geralmente, a aderência de *A. baumannii* em superfícies bióticas e abióticas resulta no desenvolvimento de biofilmes, que são complexas estruturas multicelulares tridimensionais com células em contato íntimo entre si e envoltas por uma matriz extra-celular que pode ser composta por carboidratos, ácidos nucléicos, proteínas e outras macromoléculas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). A formação de biofilme em *A. baumannii* ajuda-os a sobreviver sob condições de crescimento desfavoráveis e tratamentos antimicrobianos (JOLY-GUILLOU, 2005). Sua produção é controlada por várias células dependentes da densidade, expressão de fatores ambientes e de superfície (GADDY;ACTIS, 2009).

Alguns genes de *A. baumannii* mostraram desempenhar um importante papel na aderência e formação de biofilmes em superfícies abióticas. Estudos têm sugerido que o sistema *CsuA/BABCDE* mediam a formação de *pili* que desempenha um papel nos passos iniciais do biofilme, permitindo que as células bacterianas possam aderir a superfícies abióticas resultando na formação inicial de microcolônias que antecede o pleno desenvolvimento da estrutura de biofilme. A inativação do *CsuE* resultou na supressão da produção do *pili* bem como na formação de biofilme (TOMARAS et al, 2003; LOEHFELM et al, 2008). Este operon parece estar difundido entre os isolados clínicos, indicando que a formação de *pili* por este sistema pode ser um fator comum entre diferentes isolados clínicos. No entanto, a cepa ATCC 19606 tem capacidade de produzir um *pili* alternativo que pode participar na interação deste patógeno com células epiteliais brônquicas (DE BREIJ et al, 2009).

*A. baumannii* contém um locus *pgaABCD* que codifica uma proteína que sintetiza células associada às poli- $\beta$ -(1-6)-N-acetil glucosaminas (PNAG). A deleção deste locus levou à perda do forte fenótipo de biofilme, o qual foi restaurada pela complementação. A produção de biofilme dependente da PNAG pode ser um importante fator de virulência para este patógeno emergente (CHOI et al, 2009). Na cepa 307-0294 de *A. baumannii* o biofilme associado à proteína (Bap) foi encontrado

por participar em interações célula-célula apoiando a maturação do biofilme (LOEHFELM et al, 2008).

A aderência e formação de biofilme são processos bem organizados que respondem a uma grande variedade de estímulos celulares e ambientais (STANLEY; LAZAZZERA, 2004). Por exemplo, a adesão de *A. baumannii* a células epiteliais brônquicas, que corresponde ao de interação patógeno-hospedeiro levando à patogênese, foi aumentada pela presença e expressão de gene *bla<sub>PER-1</sub>*. Foi observada uma correlação positiva entre a presença e o nível de expressão deste gene e a quantidade de biofilme formado sobre o plástico e aderência da bactéria à célula epitelial humana (LEE, H.W. et al, 2008). No entanto, um estudo independente descobriu que apenas dois dos 11 isolados que carreavam o gene *bla<sub>PER-1</sub>* formaram biofilmes mais fortes quando comparados com os isolados sem este determinante genético (RAO et al, 2008).

Ainda com relação à capacidade de aderir a superfícies bióticas, este patógeno se adere à células epiteliais humanas e filamentos de *C. albicans*. A interação entre a cepa ATCC 19606T e *C. albicans* filamentosa são independentes do pili formado pelo sistema chaperone Usher *Csu* sugerindo que não existe nenhuma correlação direta entre a formação de biofilme em superfícies abióticas e bióticas e que existe uma grande variação na superfície celular e nas interações celulares que resultam na aderência e formação de biofilme em diferentes isolados clínicos de *A. baumannii* (GADDY; TOMARAS; ACTIS, 2009).

### 2.10.2 Quorum sensing

O *quorum sensing* (QS) é um sistema de comunicação intra e interespecies microbianas dependente da densidade populacional. Este sensoriamento populacional é realizado por meio de pequenas moléculas, denominadas autoindutores, que agem ligando-se a proteínas reguladoras de transcrição e quando uma quantidade crítica deles é atingida, as bactérias detectam a presença de um número suficiente (quorum de bactérias) e portanto, ativam / regulam a expressão de certos genes no organismo microbiano (DIGGLE; CRUSZ; CAMARA, 2007; UROZ ; DESSAUX; OGER, 2009).

Em bactérias Gram negativas, a comunicação celular é frequentemente mediada pela produção de moléculas sinalizadoras de *N*-acil-homoserina lactona

(AHL). Estudos demonstram que o QS mediado por estas moléculas regulam vários processos metabólicos, incluindo a expressão de genes de virulência, motilidade, esporulação, diferenciação celular nodulação, produção de toxina, transferência plasmidial, produção de antibióticos, bioluminescência e formação de biofilme (WHITEHEAD et al, 2001; BASSLER, 2002; WATER; BASSLER, 2005).

Este sistema é mediado por duas proteínas, pertencentes à família de proteínas LuxI e LuxR. Proteínas do tipo LuxI sintetizam AHLs que interagem diretamente com a proteínas cognatas do tipo LuxR e este complexo liga-se a uma sequência promotora específica chamada lux-box, que regula a expressão do gene alvo do QS (EGLAND; GREENBERG, 2001). AHLs produzidas por vários organismos diferem no tamanho da porção acil da cadeia (C4-C18) com o metileno, com substituição na posição C-3 do grupo hidroxila ou -oxo (BHARGAVA et al, 2010).

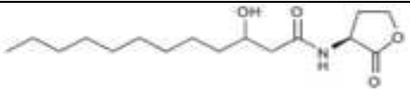
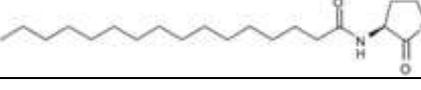
A proteína *Abal* pertence à família de autoindutora sintase *LuxI*. O gene *Abal* da cepa M2 de *A. baumannii* foi clonado em *E. coli* que catalisou a síntese de N-(3-hydroxydodecanoyl)-L-HSL (3-hidroxi-C12-HSL). O sequenciamento completo do genoma de *A. baumannii* ATCC 17978 sugeriu que o autoindutor sintase *Abal* e aciltransferases podem ser os únicos participantes na síntese de sinais de AHL de comprimentos de cadeia variados pelo organismo (Tabela 3) (NIU et al, 2008).

Em amostras de *A.baumannii* isoladas de espécimes clínicos, diferentes moléculas sinalizadoras de QS capazes de ativar AHLs foram responsáveis pela etapa inicial da cascata de sinalização e mostraram atividade máxima na fase estacionária de crescimento (GONZÁLEZ; NUSBLAT; NUDEL, 2001; GONZÁLEZ et al, 2009). No estudo de Gonzales e colaboradores, 63% das cepas de *Acinetobacter* produziram mais do que uma AHL. No entanto, nenhum dos sinais de AHL puderam ser especificamente designados para uma espécie particular do gênero (GONZÁLEZ et al, 2009). As condições nutritivas afetaram a comunicação celular e a expressão de *quorum sensing* dos genes controlados. Quatro espécies de AHL foram identificadas em *A. calcoaceticus* BD413 quando cultivada em meio mínimo contra três quando cultivadas em meio mínimo com triptona 0,1% (GONZÁLEZ; NUSBLAT; NUDEL, 2001).

Os sinais de quórum em *Acinetobacter* não são homoganeamente distribuídos, assim, a distinção entre as cepas virulentas e não virulenta baseados nos sinais de *quorum sensing* é difícil. A comunicação entre as bactérias com

respeito à densidade celular é essencial para a maturação do biofilme em *A. baumannii* (IRIE; PARSEK, 2008; NIU et al, 2008). A mutação em Abal, que produz moléculas de acil-homoserina lactona, resultou na redução de 30-40% do biofilme, quando comparado com a sua cepa isogênica parental (GADDY; ACTIS, 2009). Já a adição exógena de acil homoserina lactona purificada de *Acinetobacter* restaurou a maturação do biofilme em Abal mutante (NIU et al, 2008).

**Tabela 3.** Acil Homoserina Lactonas produzidas por *A. baumannii*

Provável HSL em <i>A. baumannii</i>	Fórmula Molecular	Estrutura
N-(3-hidroxi-dodecanoil)-L-homoserina lactona (3-OH-C12-HSL)	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>	
N-Dodecanoil-L-homoserina lactona (Insubstituições C-12-HSL)	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	
N-Dodecanoil-L-homoserina lactona (Insubstituições C-10-HSL)	C <sub>14</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	
N-Tetranoil-L-homoserina lactona (Insaturação C-14-HSL)	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>3</sub>	
N-(3-oxotridecanoil)-L-homoserina lactona (Insaturação 3-oxo-C13-HSL)	C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>	
N-Hexanoildecanoil-L-homoserina lactona (Insaturação C-16-HSL)	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>3</sub>	

**Fonte:** NIU et al, 2008.

## 2.10 CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR NO BRASIL

A infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) ou nosocomial é um grave e recorrente problema de saúde pública, tanto pela sua abrangência como pelos elevados custos sociais e econômicos que acomete tanto os países desenvolvidos quanto os em desenvolvimento. O conhecimento e a conscientização dos vários riscos de transmissão de infecções, das limitações dos processos de desinfecção e de esterilização e das dificuldades de processamento inerentes à

natureza de cada artigo são imprescindíveis para que se possam tomar as devidas precauções.

Historicamente, no Brasil, o Controle das Infecções Hospitalares teve seus marcos referenciais com as Portarias MS 196/83, 930/92 e 2.616/98 do Ministério da Saúde (MS) que normatizam e regulamentam medidas de prevenção e controle de infecção hospitalar (BRASIL, 1983; 1992; 1998). A Portaria do M.S nº 196, de 24 de junho de 1983, instituiu a implantação de Comissões de Controle de Infecção Hospitalar em todos os hospitais do país, independentemente de sua natureza jurídica (BRASIL, 1983).

A Lei Federal 9.431 de 06/01/97 instituiu a obrigatoriedade da existência da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e de um programa de Controle de Infecções Hospitalares (PCIH), definido como um conjunto de ações desenvolvidas deliberada e sistematicamente, tendo como objetivo a redução máxima possível da incidência e gravidade das infecções nosocomiais (BRASIL, 1997). Em 13/05/98, o Ministério da Saúde publicou a Portaria 2.616/98, com diretrizes e normas para a execução destas ações, adequando-as à nova legislação. Nessas portarias, é enfatizada a composição das CCIH, suas atividades, as competências de seus membros, bem como algumas recomendações e indicadores epidemiológicos para o controle das infecções (BRASIL, 1998).

Atualmente, as diretrizes gerais para o Controle das Infecções em Serviços de Saúde são delineadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde, através da Unidade de Controle de Infecções em Serviços de Saúde (UCISA). Novo impulso tem sido dado no sentido de enfrentar a problemática das infecções relacionadas à assistência à saúde (ANVISA-Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar).

A ANVISA, a partir de 2004, criou a “Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM” em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde (Opas) e a coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública do Ministério da Saúde. Ela é constituída por hospitais da Rede Sentinela (grupo de serviços de saúde preparado para notificar eventos adversos e queixas técnicas de produtos para a saúde), Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacens) e Vigilâncias Sanitárias Estaduais e Municipais, entre outros colaboradores (BRASIL, REDE RM, 2009).

O uso de antibióticos, principalmente quando indiscriminado e equivocado, facilita o surgimento de bactérias e outros microrganismos cada vez mais resistentes. Como consequência, os pacientes permanecem mais tempo internados e muitas vezes é preciso recorrer a medicamentos mais caros para garantir o sucesso do tratamento. A proposta da Rede RM é justamente mapear o perfil de sensibilidade desses microrganismos que causam infecção em pacientes internados em hospitais. Essa iniciativa contribui para o conhecimento do perfil de sensibilidade dos patógenos nos hospitais já que possibilita instituir medidas eficazes para controle e monitoramento da resistência dos microorganismos a antimicrobianos direcionando medidas de prevenção (BRASIL, REDE RM, 2009).

A infecção relacionada à serviços de saúde causa transtornos para a saúde pública, para a instituição e para os pacientes nela internados devido à significativa letalidade, sendo responsável direta ou indiretamente pela elevação das taxas de morbidade e mortalidade. Outras consequências são o aumento do tempo de internação e dos custos decorrentes tanto para a instituição quanto para os próprios pacientes e familiares, além da ameaça constante da disseminação de bactérias multirresistentes. Sendo assim, as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar são um órgão específico dentro dos hospitais que servem não somente de prevenir e combater à infecção hospitalar, beneficiando dessa maneira toda a população assistida, mas também proteger o hospital e oferecer condições de segurança a todos os clientes da instituição, de modo que as infecções hospitalares possam ser reduzidas a patamares muito baixos. A CCIH deve atuar de forma a construir um ambiente seguro para o cliente contribuindo de maneira significativa para evitar intercorrências durante o período de hospitalização (BRASIL, 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a diversidade genética, avaliar fatores de virulência e caracterizar fenotípica e molecularmente a resistência a antimicrobianos em *Acinetobacter baumannii* isolados em hospitais do Rio de Janeiro.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de resistência a agentes antimicrobianos em cepas hospitalares de *A. baumannii*;
- Pesquisar a presença de metalo-beta-lactamases e outras carbapenemases através de técnicas fenotípicas e moleculares (PCR e sequenciamento);
- Pesquisar a presença dos genes codificadores de carbapenemases de classe D: *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub> e das seqüência de inserção IS*Aba*1 e IS*Aba*4 através de técnicas moleculares como PCR e sequenciamento;
- Pesquisar a presença de integron de classe 1 através da técnica de PCR;
- Avaliar o perfil plasmidial através da lise alcalina;
- Avaliar o polimorfismo genético dos isolados através da técnica de eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE);
- Estudar filogeneticamente os isolados através de MLST (*multilocus sequencing typing*);
- Estudar os seguintes fatores de virulência: biofilme, aderência em cultura de células e *quorum sensing*;
- Verificar a interação da bactéria X célula em modelo de cultura de células do tipo A-549.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Foram estudados 141 isolados de *Acinetobacter baumannii* coletados de pacientes internados em UTIs ou enfermarias cirúrgicas de 10 diferentes hospitais da rede pública e privada, no período de 2005 a 2007, no Rio de Janeiro: Hospital Quinta D'Or, Hospital Copa D'Or, Hospital Barra D'Or, Hospital Federal de Bonsucesso, Hospital IPEC, Hospital Pedro II, Hospital Universitário Antônio Pedro, Hospital dos Servidores do Estado, Hospital da Lagoa e Hospital Vital. Estes isolados bacterianos pertencem à Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse Hospitalar do IOC (CCBH/IOC) e estão estocados em caldo BHI (Difco) contendo 20% (v/v) de glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Os isolados foram identificados inicialmente nos Laboratórios dos hospitais de origem com o auxílio do sistema automatizado VITEK (Bio Mérieux Inc., Hazelwood, Mo). No laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do IOC, foram realizados os seguintes testes para confirmação da identificação, após verificação da pureza das culturas: observação das características morfo-tintoriais após coloração pelo método de Gram, teste da reação da citocromo oxidase, teste de oxidação-fermentação da glicose em meio de Hugh-Leifson, meio de Costa e Vernin (CV), Citrato de Simmons (CIT), mobilidade (com 1% de TTC -Tetrafenil Tetrazolio) e crescimento a  $42^{\circ}\text{C}$ . Estes testes bacteriológicos convencionais foram realizados segundo Murray e colaboradores (MURRAY, 2007).

A confirmação da identificação dos isolados foi realizada através da técnica de ARDRA (*Amplified ribosomal DNA restriction Analysis*) e PCR do gene *bla*<sub>OXA-51</sub> (VANEECHOUTTE et al, 1995; TURTON et al, 2006a). Na técnica ARDRA, os produtos de PCR do gene 16S rRNA foram digeridos com *DdeI*, *AluI*, *MspI*, *NciI* e *HinP1I*. Os resultados, definidos pela combinação dos perfis de restrição obtidos com as respectivas enzimas, foram interpretados de acordo com o esquema de Dijkshoorn e colaboradores (DIJKSHOORN L, 1998).

### 4.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A suscetibilidade aos agentes antimicrobianos foi avaliada em todos os 141 isolados de *A. baumannii* utilizando-se o teste de disco-difusão em Agar para sete grupos de antibióticos (carbapenemas, fluoroquinolonas, cefalosporinas, aminoglicosídeo, monobactâmicos, beta-lactâmicos associados a inibidor de beta-lactamases e sulfamidas) conforme as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2010). Os isolados foram cultivados em Agar Infusão Cérebro e Coração (BHI-DIFCO) por 18 a 24 horas a 37°C. O inóculo bacteriano foi suspenso em solução de cloreto de sódio 0,85% e a concentração ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland ( $\sim 10^8$  UFC/mL). Em seguida, a suspensão foi inoculada com o auxílio de “swab” estéril sobre uma placa de Agar Mueller-Hinton (AMH-OXOID), no qual, após secar por 15 minutos, foram aplicados os discos impregnados com os antibióticos. As placas foram incubadas por 18 a 24 h a 37°C. Foram utilizados os seguintes discos de antimicrobianos: amicacina (30µg), ampicilina/sulbactam (20µg), aztreonam (30µg), cefepime (30µg), ceftazidima (30µg), ciprofloxacina (5µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), piperacilina/tazobactam (110µg) e trimetropim/sulfametoxazole (25µg). Para o controle do teste foram utilizadas as cepas padrão: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27852). A suscetibilidade foi verificada através da leitura do diâmetro dos halos de inibição interpretados de acordo com os valores estabelecidos pelo CLSI (2010). Foram considerados multirresistentes os isolados que apresentaram resistência pelo menos três grupos de antimicrobianos testados.

A concentração inibitória mínima (CIM) para imipenem, meropenem, tigeciclina e polimixina B foram realizadas através do teste epsilométrico (E-test) (AB Biodisk, Solna, Sweden). Os valores de CIM para imipenem, meropenem e polimixina B foram interpretados de acordo com o CLSI (2010), para tigeciclina foram interpretados de acordo com a Food and Drug Administration (FDA).

#### 4.4 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES E METALO-BETA-LACTAMASES (MBL)

Para a detecção de carbapenemases, foi utilizado o teste de Hodge modificado conforme descrito por Lee e colaboradores (2001). A superfície do meio Ágar Mueller Hinton foi inoculada com a suspensão padronizada (0,5 de McFarland) de *Escherichia coli* ATCC 25922 diluída de 1:10. Um disco de imipenem foi colocado no centro e as amostras a serem testadas foram semeadas em estrias perpendiculares. Após incubação, a presença de distorção do halo do imipenem foi considerada como resultado positivo.

Para a detecção das metalo-beta-lactamases IMP e VIM, foi utilizado o teste de aproximação de discos utilizando ácido 2-mercaptopropiônico (2MP) como inibidor de metalo-beta-lactamase conforme descrito por Arakawa e colaboradores (2000). Os isolados foram cultivados em Ágar infuso de cérebro e coração (BHI) por 18 a 24 horas a 37°C. O inóculo bacteriano foi suspenso em solução de cloreto de sódio 0,85% e a concentração das células ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland (~ 10<sup>8</sup> UFC/mL). Em seguida a suspensão foi inoculada com o auxílio de “swab” estéril sobre placas de AMH. Após 15 minutos, dois discos de antibióticos, contendo cada um, 30 µg de ceftazidima, foram aplicados sobre a superfície do Agar a uma distância de 4,5 cm. Um disco de papel de filtro foi aplicado a uma distância de cerca de 2 cm de um dos discos de ceftazidima, onde foram adicionados 3 µl de uma solução contendo 1,2g/mL de ácido 2-mercaptopropiônico (2MP) (MERK). A placa foi incubada a 37° C por 18 a 24 horas. A observação da expansão da zona de inibição do crescimento bacteriano no disco de ceftazidima, localizado próximo ao disco com MP, indicou a produção de MBL pelo isolado bacteriano.

#### 4.5 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL POR TIOCIANATO DE GUANIDINA

As amostras foram submetidas à extração do DNA genômico como descrito por Caetano-Anollés e colaboradores (1997) Os isolados foram cultivados em 3 mL em caldo tríptico de soja (TSB) ou BHI com agitação a 37°C por 24h. Foram transferidos 1,5 mL do crescimento para um microtubo tipo eppendorf, submetidos a

centrifugação por 10 minutos a 11.180 g, em seguida, foi desprezado o sobrenadante. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Em seguida foi adicionado 1 mL de NaCl 1M para ressuspender o “*pellet*”, agitando em agitador tipo vortex. Esta etapa foi repetida 2 vezes, intercalando-as com centrifugação. O *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE (Tris10mM: EDTA1mM pH, 8,0) e 500 µL da solução de guanidina. A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada a -20 °C durante 5 minutos. Logo em seguida, foram adicionados 250 µL de acetato de potássio 5M, o tubo foi homogeneizado por inversão e incubado a -20 °C durante 5 minutos. Logo após, foram adicionados 500 µL de solução clorofórmio:álcool Isoamílico (24:1), com agitação em agitador tipo vórtex até obtenção de uma cor leitosa.

A solução leitosa foi centrifugada por 10 minutos a 11.180g. Foram retirados aproximadamente de 750 µL da fase superior da solução que foi transferida para novos microtubos contendo 380 µL de isopropanol. Esta solução permaneceu em repouso a -20 °C por 24horas.

No outro dia, o material foi centrifugado e o sobrenadante desprezado. Ao DNA mantido no fundo como um pequeno “*pellet*”, foram adicionados 150 µL de álcool etílico 70% com posterior centrifugação, por 2 vezes. O sobrenadante foi desprezado para permitir a secagem natural do “*pellet*” em temperatura ambiente. Ao final, o “*pellet*” foi solubilizado em 100 µL de TE e incubado em banho termostático a 37°C por 3 horas. O DNA extraído foi estocado a -20°C.

#### 4.6 PESQUISA DE SEQUÊNCIAS GÊNICAS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Foram realizadas reações de PCR para a detecção das seguintes sequências gênicas: carbapenemases de classe B (Metallo-beta-lactamases) *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> (KIMURA et al, 2005); carbapenemases de classe D (oxacilinas) *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub> e *bla*<sub>OXA-58-like</sub> (JEONG et al, 2006; TURTON et al, 2006a); integrases *int1* (classe 1) (LÉVESQUE et al, 1995). Foram também realizadas PCR da sequência de inserção *ISAb*<sub>a1</sub> (TURTON et al, 2006b) e *ISAb*<sub>a4</sub> (CORVEC et al, 2007) para os isolados sensíveis ao imipenem. A oxacilinase OXA-143 e a metalo-beta-lactamase SPM não foram pesquisadas neste estudo.

Para a amplificação de regiões específicas do genoma dos isolados de *A. baumannii*, a reação da PCR foi realizada em um volume final de 50 µL. As reações individuais foram compostas de água milli-Q, tampão de reação 1X, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfatado (dNTP) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 25 ng de cada iniciador (Tabela 4), 1,5 U da enzima *Taq* polimerase e 1µL do DNA obtido pela extração por guanidina, como descrito anteriormente.

As reações foram realizadas nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72°C por 5 minutos. A amplificação pela PCR foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TrisBoratoEDTA (TBE) 0,5X.

**Tabela 4.** Iniciadores utilizados nas reações de PCR.

Região alvo	Sequência do iniciador (5'→3')	Referência
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	IMP1F- CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG	KIMURA et al, 2005
	IMP1R- AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT	
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	VIM2F- GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC	KIMURA et al, 2005
	VIM2R- CTA CTC AAC GAC TGA GCG ATT TGT	
<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	OXA23 F- ACT TGC TAT GTG GTT GCT TCT C	JEONG et al, 2006
	OXA23 R- TGT CAA GCT CTT AAA TAA TAT TCA GC	
<i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub>	OXA24 F- CAA GGA CTG GCC TAG AG	JEONG et al, 2006
	OXA24 R- ATT AGC TTG CTC CAC CCA AC	
<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	OXA51 F- TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	TURTON et al, 2006a
	OXA51 R- TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	
<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub>	OXA58F- CGA TCA GAA TGT TCA AGC GC	JEONG et al, 2006
	OXA58R- ACG ATT CTC CCC TCT GCG C	
<i>Int1</i>	Int1F- GGC ATC CAA GCA GCA AG	LÉVESQUE et al, 1995
	Int1R- AAG CAG ACT TGA CCT GA	
IS <i>Aba1</i>	IS <i>Aba1</i> F – CAC GAA TGC AGA AGT TG	TURTON et al, 2006b
	IS <i>Aba1</i> R – CGA CGA ATA CTA TGA CAC	
IS <i>Aba4</i>	IS <i>Aba4</i> F-ATT TGA ACC CAT CTA TTG GC	CORVEC et al, 2007
	IS <i>Aba4</i> R-ACT CTC ATA TTT TTT CTT GG	

#### 4.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os géis foram preparados com agarose em tampão TBE 0,5X (Tris, ácido bórico e EDTA) de modo a obter uma concentração de 1,5 %. Foram aplicados 7  $\mu$ L do produto da PCR e 1  $\mu$ L de marcador de peso molecular nos poços inicial e final do gel. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida TBE 0,5X sob uma corrente de 60 Volts. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/mL), observado sob luz ultravioleta e registrado com o equipamento Image Quant 300.

#### 4.8 SEQUENCIAMENTO

Os produtos da PCR foram purificados usando a coluna de purificação GFX PCR DNA gel band purification kit (GE Healthcare, UK) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados no sequenciador ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação com dideoxynucleotídeos usando o Big Dye terminator v.3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). As análises e comparações das seqüências foram realizadas com o auxílio dos aplicativos BLAST (*National Center for Biotechnology Information*; [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) e Bionumerics versão 4.0 (Applied Maths). Todo o sequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz.

#### 4.9 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

Foram submetidos à avaliação do polimorfismo genético por PFGE os 141 isolados de *A. baumannii*. Foi realizada a técnica segundo o protocolo *Pulsenet* (NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES, 2004), com algumas modificações, utilizando a enzima de restrição *Apal*. O DNA cromossômico foi preparado pela técnica de uso *in situ*, em blocos de agarose (1% agarose Seaken Gold) com 1% dodecil sulfato de sódio (SDS). Em resumo, uma alíquota do crescimento bacteriano em fase exponencial foi suspensa em, aproximadamente, 2 mL de tampão para suspensão celular BSC (100mM Tris: 100mM EDTA, pH 8,0) para a obtenção da turvação correspondente a 3 da escala de McFarland. Aos 500

$\mu$ L da suspensão de células, foi adicionado volume igual de agarose *low melting* a 1,1 % (Seaken Gold Agarose) na temperatura de 50°C e 0,5  $\mu$ L de proteinase K (Sigma). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Os blocos foram então transferidos para tubos, contendo 2 ml de solução de lise (TRIS-HCl 50mM:EDTA 50mM, pH 8,0+ sarcosil a 1%) mais 0,5  $\mu$ L de proteinase K e foram incubados por 2 horas a 50°C. Em seguida, o tampão de lise foi retirado e os blocos foram lavados por 3 vezes com 10 mL de água Milli-Q por 15 minutos a 50°C e 1 vez com tampão TE nas mesmas condições. Os blocos foram então incubados com 10 U da enzima de restrição *Apal* (Amersham) durante 2 horas a 30°C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose à 1% preparado em tampão TE através da eletroforese de campo pulsado, usando o aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, USA). Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: tempo de pulso crescente de 0,5 a 15 segundos, por 18 horas a 6V/cm, na temperatura de 14°C, com ângulo de 120°. Após a corrida os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL), observados e fotografados no Image Master VDS (Pharmacia Biotech). A análise dos genótipos foi realizada através de inspeção visual dos géis de agarose com base nos critérios estabelecidos por Tenover e colaboradores (1995) (TENOVER, 1995). Os resultados obtidos foram analisados através de dendrogramas confeccionados a partir da análise da foto do gel no *software* Gel Compar II versão 4.0.

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DO ST PELO MÉTODO DE “MULTILOCCUS SEQUENCE TYPING” (MLST)

Dentre os 96 isolados produtores da carbapenemase OXA-23 foram selecionados isolados representativos dos genótipos obtidos através do PFGE, que foram: 305LGB (Genótipo A), 356 LGB (Genótipo B), 539 LGB (Genótipo C) e 71LGB (Genótipo D). Estes isolados foram submetidos a métodos de tipagem baseados em sequência de nucleotídeos, incluindo PCR para identificação da sequência do grupo (SG) (TURTON et al, 2007), sequenciamento do gene *bla*<sub>OXA-51</sub> (EVANS et al, 2008) e dois esquemas de MLST (BARTUAL et al, 2005; NEMEC et al, 2008). Além disso, estes genótipos foram comparados com isolados representativos de Portugal e da República Tcheca (F. Grosso, S. Quinteira e L.

Peixe, resultados não publicados), pertencentes ao “Sequence type” ou Sequência de Alelos ST92 (essencialmente produtores de OXA-23), ST98 (produtores de OXA-40) e ST103 (produtores de OXA-58). Este estudo foi realizado em colaboração com a Dra. Luisa Peixe do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia, na Universidade do Porto, Porto, Portugal.

A identificação dos SGs baseados na PCR foi conduzida a fim de estabelecer a associação entre os clones europeus de *A. baumannii* [EU-I (SG2), EU-II (SG1) e EU-III (SG3)] (TURTON et al, 2007; DIANCOURT et al, 2010; TOWNER; LEVI; VLASSIADI, 2007) e os genótipos deste estudo. Os dois esquemas distintos de análise do MLST foram chamados de MLST-OD (relacionado ao banco de dados Oxford) e MLST-IP (desenvolvido pelo Instituto Pasteur) (BARTUAL et al, 2005; NEMEC et al, 2008). A localização genética do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foi realizada com digestão da enzima I-Ceul e a transferência e o sequenciamento com sondas específicas para *bla*<sub>OXA-23</sub> e 16S rRNA (CORVEC et al, 2007). A associação do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> com o transposon Tn2006 foi determinada pela PCR (CORVEC et al, 2007).

#### 4.11 ANÁLISE DE DADOS

As sequências de nucleotídeos foram submetidas à base de dados de MLST para *A. baumannii* (MLST-OD, <http://pubmlst.org/abaumannii/>; e MLST-IP, <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html>) (Tabela 5 e 6) para designação do número de alelos e STs.

**Tabela 5.** Fragmento de genes conservados utilizados para *Acinetobacter baumannii* no MLST-OD.

<b>Loco</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequências</b>
<i>gltA</i> - Citrato sintase	Citrato F1	AAT TTA CAG TGG CAC ATT AGG TCC C
	Citrato R12	GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G
<i>gyrB</i> - Subunidade B da DNA girase	APRU F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCN GGR TCY TTY TCY TGR CA
	M13 [-21]	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
<i>gdhB</i> - Glicose desidrogenase	UP1E R	CAG GAA ACA GCT ATG ACC AYG SNG GNG GNA ART TYR A
	M13 F	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
	GDHB 1F	GCT ACT TTT ATG CAA CAG AGC C
<i>recA</i> - Fator de recombinação homóloga	GDH SEC F	ACC ACA TGC TTT GTT ATG
	GDHB 775R	GTT GAG TTG GCG TAT GTT GTG C
	GDH SEC R	GTT GGC GTA TGT TGT GC
	RA1	CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC
<i>cpn60</i> - Chaperonina 60kDa	RA2	GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC
	CPN 3F2	ACT GTA CTT GCT CAA GC
<i>gpi</i> -Glicose 6-fosfato isomerase	CPN R2	TTC AGC GAT GAT AAG AAG TGG
	GPI F1	AAT ACC GTG GTG CTA CGG G
	GPI R1	AAC TTG ATT TTC AGG AGC
<i>rpoD</i> - Fator sigma da RNA polimerase	70F RPOD	ACG ACT GAC CCG GTA CGC ATG TAY ATG MGN GAR ATG GGN AC NGT
	70FS	ACG ACT GAC CCG GTA CGC ATG TA
	70R RPOD	ATA GAA ATA ACC AGA CGT AAG TTN GCY TCN ACC ATY TCY TT YTT
	70RS	ATA GAA ATA ACC AGA CGT AAG TT

MLST-OD: relacionado ao banco de dados Oxford.  
BARTUAL et al, 2005

As sequências dos alelos (ST) foram analisadas e comparadas com aquelas já existentes no *website* acima descrito para a determinação dos STs. Os novos alelos encontrados (STs) foram adicionados ao banco de dados. Os isolados com cinco ou mais alelos idênticos (MLST-OD) foram considerados parte do mesmo complexo clonal (CC), de acordo com o programa de *software eBURST* (<http://eburst.mlst.net/>) (FEIL et al, 2004).

**Tabela 6.** Fragmento de genes conservados utilizados para o *Acinetobacter baumannii* no MLST-IP.

Loco	Primer	Sequências
<i>gltA</i> - Citrato sintase	Citrato F1	AAT TTA CAG TGG CAC ATT AGG TCC C
	Citrato R12	GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G
<i>cpn60</i> - Chaperonina 60kDa	CPN 3F2	ACT GTA CTT GCT CAA GC
	CPN R2	TTC AGC GAT GAT AAG AAG TGG
<i>recA</i> - Fator de recombinação homóloga	RA1	CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC
	RA2	GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC
<i>fusA</i> - Fator proteico de alongação EF-G	<i>F: fusA7</i>	ATCGGTATTTCTGCKCACATYGAT
	<i>R: fusA8</i>	CCAACATACKYTGWACACCTTTGTT
<i>pyrG</i> - CTP sintase	<i>F: pyrG7</i>	GGTGTGTTTCATCACTAGGWAAAGG
	<i>R: pyrG8</i>	ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA
<i>rplB</i> - Proteína ribossomal L2 da subunidade 50S	<i>F: rplB7</i>	GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC
	<i>R: rplB8</i>	CACCACCACRTGYGGGTGATC
<i>rpoB</i>	<i>F: Vic4</i>	GGCGAAATGGC(AGT)GA(AG)AACCA
	<i>R: Vic6</i>	GA(AG)TC(CT)TCGAAGTTGTAACC

MLST-IP: desenvolvido pelo Instituto Pasteur.  
NEMEC et al, 2008

#### 4.12 ANÁLISE DO PERFIL PLASMIDIAL

Todas as amostras bacterianas foram submetidas à lise alcalina conforme descrito por Sambrook & Russell (2001) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Os isolados foram cultivados em erlenmeyer contendo 5 mL de caldo TSB por 24h a 37°C. Para a obtenção de quantidade suficiente de DNA plasmidial para visualização em eletroforese, foi necessário concentrar o equivalente ao processamento de 2 microtubos da cultura (1,5 mL por tubo) para cada isolado. Estas alíquotas foram centrifugadas a 4°C na velocidade de 11.180g por 1 minuto e o sobrenadante desprezado.

A seguir, foram adicionados ao precipitado, 300µL da solução P1 (2mg/mL de liozima, glicose 50mM, EDTA10mM, Tris-HCl 25mM pH 8,0) e a mistura foi agitada em agitador tipo vórtex. A lise celular foi realizada pela adição de 300 µL da solução P2 (NaOH 0,2 N e SDS a 1%) seguido de uma gentil homogeneização. A ação desta solução foi neutralizada pela adição de 300 µL da solução P3 (acetato de sódio 3M pH 4,8) com incubação durante 20 minutos em banho de gelo. Após centrifugar por 10 minutos (4°C a 11.180g), 600 µL do sobrenadante foram transferidos para novos

microtubos. Foram então, adicionados 480  $\mu\text{L}$  de isopropanol (0,8v), e sendo os tubos submetidos novamente à centrifugação.

Depois de retirado todo sobrenadante, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  álcool etílico 70% retirando-o rapidamente. Após secagem, foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de água mili-Q com Rnase que permaneceu por 30 minutos em temperatura ambiente.

A eletroforese foi realizada em cuba horizontal, aplicando-se a amostra no gel de agarose a 0,8% em TBE 0,5X (Tris, Ácido bórico e EDTA), mantendo-se uma corrente elétrica inicial de 60V até a amostra penetrar no gel, e após 30 minutos, a corrente foi aumentada para 120V por aproximadamente 2 horas. Seguindo-se a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL) durante 15 minutos e fotografados sob luz ultravioleta no sistema de transiluminação “Image Quant 1.0” de acordo com o procedimento de utilização do equipamento. Para o controle, foram utilizadas *Escherichia coli* V517 e *Escherichia coli* R 861.

#### 4.13 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

A quantidade de biofilme formado pelos isolados de *A. baumannii* foi medida através do ensaio para formação de biofilme em placa de microtitulação com 96 poços, realizado de acordo com Moskowitz e colaboradores, 2004 (MOSKOWITZ et al, 2004). Todos os 141 isolados foram semeados em Agar nutriente, incubados a 37 °C por 18 a 24 horas. O inóculo bacteriano foi suspenso em caldo Luria-Bertani (LB) e a concentração ajustada para uma suspensão equivalente a 0,5 na escala de McFarland e então, foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra para uma placa de microtitulação de 96 poços (Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y. catálogo nº. 269787). Cada amostra foi testada em triplicata e três poços contendo apenas caldo LB foram utilizados como controle negativo. O biofilme foi formado numa tampa especial de poliestireno contendo pinos (Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y. catalogo nº. 445497) que foram imersos nos orifícios da placa de microtitulação. Este sistema foi incubado a  $35\pm 2$  °C por 24 h sem agitação.

Após a incubação, a tampa com pinos foi lavada três vezes com água mili-Q estéril para retirada das bactérias que não faziam parte do biofilme. Para corar este biofilme, a tampa com pinos foi colocada em uma solução aquosa de cristal violeta a 0,1% por 15 minutos. A seguir, a tampa foi lavada mais três vezes com água mili-Q

para retirar o excesso de cristal violeta e foi deixado, em temperatura ambiente para secar, por aproximadamente 1 hora.

A fim de solubilizar o cristal violeta adsorvido, a tampa com pinos foi imersa em 95% de etanol (150  $\mu$ L por poço da placa de microtitulação) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, a placa de microtitulação foi levada ao espectrofotômetro (Spectramax 190 Gemini ELISA, Molecular Devices Corp. Sunnyvale, Calif.) e a absorbância da solução de cada poço foi medida a 595nm.

A classificação das amostras quanto à capacidade de formar biofilme foi feita com relação à densidade óptica do controle negativo (Doc). Os biofilmes receberam a classificação de: não produtor de biofilme ( $DO \leq Doc$ ), fraco ( $DOc < DO \leq 2xDOc$ ), moderado ( $2xDOc < DO \leq 4xDOc$ ) e forte ( $DO \geq 4xDOc$ ) (STEPANOVI et al, 2000). *A. baumannii* ATCC 19606 foi utilizado como controle positivo e como controle negativo, os poços com meio de cultura não inoculados. Também foi incluída a cepa de *Escherichia coli* K-12, considerada um fraco produtor de biofilme. Os dados foram expressos em valores médios  $\pm$  desvio padrão (DP), e P valores  $\leq 0.005$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 4.14 ADERÊNCIA EM CULTURA DE CÉLULAS

Este estudo foi realizado em colaboração com a Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani, sob orientação da Dra. Luciana Silva Rodrigues do laboratório de Microbiologia Celular do IOC.

##### 4.14.1 Isolados bacterianos

Para este estudo foram selecionados os isolados bacterianos representativos dos clones prevalentes A (305 LGB) e B (356 LGB), a cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606. A cepa de *Yersinia enterocolítica* O:3, utilizada como controle positivo para invasão bacteriana, foi gentilmente cedida pela Dra. Dayse Christina Valim do Laboratório de Listeria do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). Esta cepa foi isolada a partir de suíno na região tonsilar/língua e pertence ao acervo da Coleção de Cultura de Bactérias de Interesse em Saúde (CCBS) / Coleção de *Listeria* (CLIST).

#### 4.14.2 Cultivo e manutenção de células epiteliais alveolares

##### 4.14.2.1. *Meio de cultivo de células eucarióticas*

Para o cultivo das células epiteliais alveolares, foi utilizado meio D-MEM/high-glucose completo (LGC Biotecnologia). Foi adicionado 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Gibco) no momento da sua utilização, assim como a combinação de antibióticos penicilina/estreptomicina a 100U/mL (PEES; Sigma).

##### 4.14.2.2 *Linhagem celular*

As células epiteliais alveolares humanas da linhagem A-549 foram adquiridas do banco de células ATCC (American Type Culture Collection). Para o início do cultivo, as células estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em banho termostático a 37°C, e ressuspensas em um volume de 10 mL de meio D-MEM/high-glucose completo (suplementados com 100U/mL de PEES e 10% SFB). As células foram incubadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (NUNC A/S) em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, até obter uma confluência de 80%. As células epiteliais foram desprendidas adicionando-se 1 mL de tripsina (2,5%) e levadas à estufa por 1 minuto a 37°C. Em seguida, 9 mL de meio DMEM completo foi adicionado e a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 730g. As células foram ressuspensas em 10 mL de meio, inoculando-se 2 mL da cultura em garrafa contendo 5 mL de meio completo. As células a serem utilizadas nos experimentos foram contadas em câmara de Neubauer e em seguida plaqueadas.

##### 4.14.2.3 *Marcação de bactérias com kit PKH-2 fluorescente*

A marcação dos isolados foi feita utilizando o kit PKH-2 Green Fluorescent Cell Linker (Sigma), de acordo com a metodologia de Mattos e colaboradores (2011). Aproximadamente  $2 \times 10^7$  UFC de bactérias foram centrifugadas a 14.000g por 10 minutos, ressuspensas em solução contendo o diluente A e a solução de PKH2 a 4 µM (fornecidos pelo kit) na mesma proporção e foram incubadas de 2-5 minutos em temperatura ambiente protegidos da luz e invertendo-se o tubo periodicamente. Em seguida foi adicionado igual volume de SFB para neutralização

que foi então incubada por 1 minuto a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. Esta suspensão bacteriana foi diluída em volume igual de meio de cultura e centrifugada por 10 minutos a 17.530g. O sobrenadante foi removido e as bactérias lavadas 2 vezes com meio de cultura para a retirada do excesso de fluorocromo. Ao final, as bactérias foram ressuspensas no volume inicial de meio de cultura e prontamente utilizadas.

#### 4.14.2.4 *Preparo das amostras de A. baumannii*

Para o início do cultivo, isolados foram descongelados, e um inóculo de cada isolado foi adicionado ao caldo nutriente e foi mantido por 18-24h a 37°C. Após, foi feito um novo cultivo em ágar nutriente por 18 a 24 horas a 37°C. O inóculo bacteriano foi suspenso em 1,5 mL de meio D-MEM/ high glicose e a concentração ajustada de acordo com o padrão 2 da escala de McFarland. As células epiteliais foram plaqueadas ( $4 \times 10^4$  células) por 24 horas em 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C em placa de 24 poços com ou sem lamínula de vidro.

A seguir, o sobrenadante das células foi descartado, adicionado novo meio e adicionados 50 µL das bactérias previamente marcadas ou não com PKH-2 diluídas em meio de cultura específico sem antibiótico. As células foram centrifugadas a 730g por 5 minutos à temperatura ambiente e incubadas por 2 horas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.14.3 Avaliação do grau de associação das bactérias

Para avaliação do grau de associação das bactérias às células epiteliais alveolares (A-549), foram realizadas diferentes metodologias:

##### 4.14.3.1 *Citometria de Fluxo*

Após a incubação de 2 h a 37°C, as células coradas com PKH-2 foram lavadas 3 vez com tampão fosfato salino (PBS) estéril e foi adicionado PBS acrescido de soro fetal bovino (SBF) a 2%. As células foram soltas com auxílio de um scraper e o sobrenadante transferido para microtubo e centrifugado a 357,8g por 10 minutos, à temperatura ambiente. O “pellet” foi coberto com paraformaldeído (PFA) a 4% e permaneceu por 20 minutos na geladeira. A seguir foi adicionado PBS

sem soro e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas com 400 µL de PBS armazenadas na geladeira (MATTOS, 2011). O número de bactérias associadas às células foi analisado em citômetro de fluxo (AccuriC6) utilizando o programa CFlow Plus, onde foram feitas aquisições de 10.000 eventos no canal FL1-A. Cada experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.14.3.2 *Microscopia Óptica*

Finalizadas as 2 horas de incubação as lamínulas foram lavadas 2 vezes com PBS, as células fixadas por 10 minutos com metanol e coradas por 30 minutos com Giemsa (LEE, J.C. 2006). As lamínulas foram posteriormente dispostas sob lâminas de vidro, visualizadas e fotografadas no microscópio óptico com lente de imersão num aumento de 1000x.

#### 4.14.3.3 *Microscopia de Fluorescência*

Finalizadas as 2 horas de incubação, cada poço foi lavado com PBS, fixado com PFA 4% por 20 minutos a temperatura de 4°C e novamente lavado 2 vezes com PBS. Após esse tempo, foi adicionado 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (diluído 1:100) e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Para finalizar foram feitas mais 3 lavagens com PBS. As lâminas foram montadas com antifading (AFA-Vecta Shield), seladas com Entellan, observadas e fotografadas no microscópio de fluorescência com lente de imersão (Nikon Eclipse E400) em um aumento de 1000x.

### 4.15 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUORUM SENSING

Os isolados de *Acinetobacter baumannii* foram investigados quanto à habilidade de produzir moléculas sinalizadoras de Acil homoserina lactona (AHL) utilizando-se a cepa indicadora de AHL *Agrobacterium tumefaciens* (NT1). O ensaio foi realizado segundo Gonzales et al, 2009 com algumas modificações (GONZÁLEZ et al, 2009). Para este ensaio foram selecionados os seguintes isolados de *A. baumannii* pertencentes aos clones prevalentes, 305 LGB (clone A) e 356LGB (clone B), a cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606 e a cepa controle positivo de

“quorum sensing” *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Este estudo foi realizado em colaboração com a Dra. Denise Dagnino da Universidade Estadual Norte Fluminense.

#### 4.15.1 Preparo e concentração do extrato de *A. baumannii*

Inicialmente, *A.baumannii* foi cultivado em ágar sangue por 24 horas a 37°C. Uma colônia de cada foi então transferida para um erlenmeyer de 250 mL contendo meio mineral (MMAT) com a seguinte composição: 37 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0,81 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,8 mM FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 68 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 95 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1mL/L de uma solução contendo 50 g de EDTA, 2,2g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,6 g CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 5 g MnCl<sub>2</sub>, 1,1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, 50 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10 mg KI e 50 mg CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O. A este meio, foi adicionada uma fonte de carbono de 1% de ácido láctico com 10g/L de ácido acético. O pH final deste meio foi de 6,9. As culturas foram incubadas com agitação (100rpm) a 30°C por 24h.

#### 4.15.2 Preparo das amostras

Os isolados selecionados foram cultivados em erlenmeyer contendo 20 mL de MMAT a 28°C sob agitação constante de 100rpm por 24 horas. O crescimento foi centrifugado a 18.894g por 10 minutos e 3 mL do sobrenadante foi filtrado em membrana de celulose com poros de 0,22 µm.

O sobrenadante livre de células foi submetido a extração orgânica por duas vezes com igual volume de acetato de etila (MeOH) com 0,1% de ácido acético. Concentrou-se a fase orgânica em centrífuga a vácuo até a total evaporação do solvente. O resíduo foi solubilizado em 5 µL de MeOH e estocado a -20°C. A extração orgânica do meio de cultura MMAT, sem inóculo bacteriano, foi utilizado como controle negativo do extrato. Como controle positivo, foi utilizado o extrato do sobrenadante de cultura de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e também foram utilizadas soluções de referência na concentração de 10 mM de N-octanoil-DL-homoserina lactona (C8-HSL, Fluka) e N- (3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (C12-HSL, Fluka) em metanol.

A cepa indicadora *Agrobacterium tumefaciens* foi cultivada em 20 mL de meio VB (peptona de caseína, extrato de levedura, NaCl, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e Tris 1M)

contendo 5 µg/mL of canamicina e 2 µg/mL de carbenicilina a 28°C sob agitação constante de 100rpm por aproximadamente 6 horas.

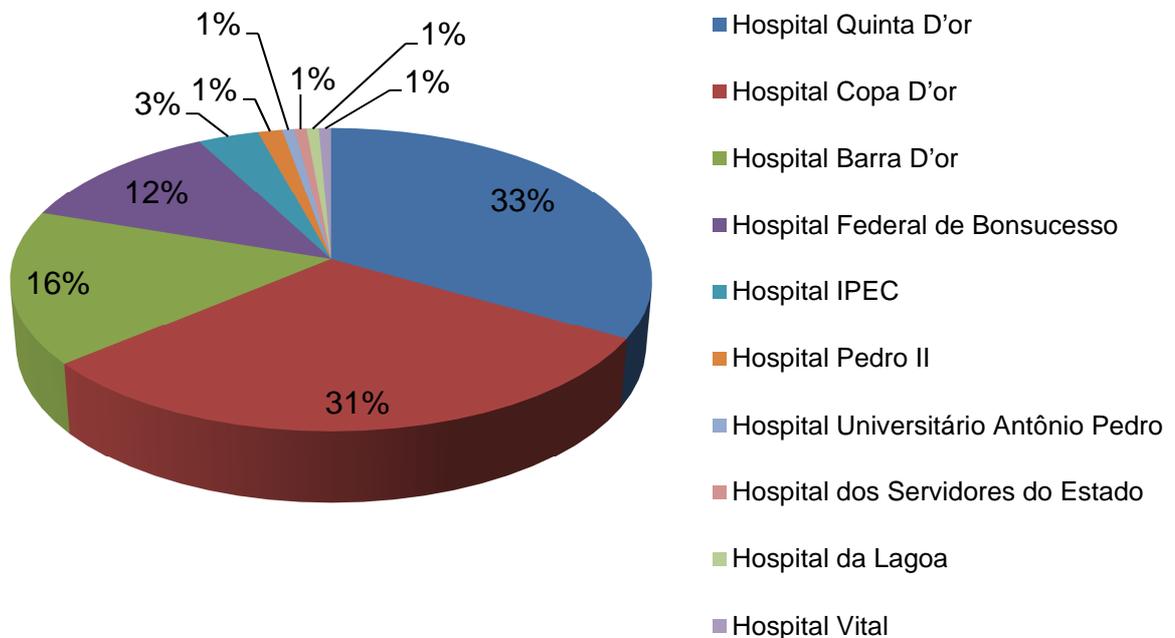
#### 4.15.3 Ensaio de detecção do autoindutor

Este ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. Em resumo, foram adicionados a cada poço: 15µL cultura *A. tumefaciens* NT1 diluída 3X em meio VB, 30 µL em solução de cloreto de sódio 0,85%, 5 µL de X-Gal (0,4mg/mL) e 1µL dos extratos de *A. baumannii* diluídos em 5µL de MeOH. As placas foram incubadas a 28°C por 24h a 48h. Para o teste foram utilizados como controle positivo os padrões da Fluka de C<sub>8</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL e a cepa *P. aeruginosa* PAO1, que detecta AHL com 4 a 8 cadeias de carbono. O extrado com o meio MMAT sem bactéria foi utilizado como controle negativo. A atividade de *quorum sensing* foi detectada pela presença da coloração azul nos poços da placa de microtitulação.

## 5 RESULTADOS

Dentre os 141 isolados estudados, a maioria foi proveniente do Hospital Quinta D'or (33,3%) e do Hospital Copa D'or (30,5%), em seguida ficaram Hospital Barra D'or (16,3%), Hospital Federal de Bonsucesso (12,1%), Hospital IPEC (3,5%), Hospital Pedro II (1,4%), Hospital Universitário Antônio Pedro (0,7%), Hospital dos Servidores do Estado (0,7%), Hospital da Lagoa (0,7%) e Hospital Vital (0,7%) (Figura 2).

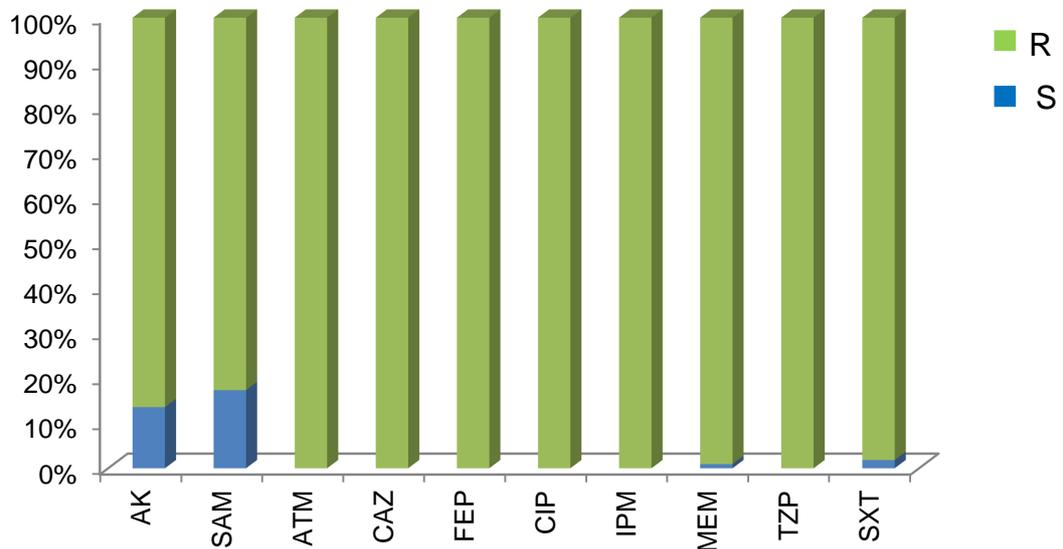
**Figura 2.** Percentual de distribuição dos 141 isolados de *A. baumannii* coletado por hospital público ou privado.



A avaliação da susceptibilidade aos antibióticos revelou que 110 isolados foram resistentes ao imipenem e 31 susceptíveis a esse antimicrobiano.

Os 110 isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem apresentaram elevados percentuais de resistência para todos os antimicrobianos testados, sendo superiores a 98,2% para oito dos dez antimicrobianos testados: ceftazidima, ciprofloxacina, piperacilina/ tazobactam (100% cada), aztreonam, cefepime, meropenem (99,1%) e trimetropima/sulfametoxazole (98,2%). Ampicilina/sulbactam foi o antimicrobiano que apresentou maior taxa de susceptibilidade (17,3%) seguido de amicacina (13,6%) (Figura 3, Tabela 7).

**Figura 3.** Perfil de Resistência aos Antimicrobianos dos 110 isolados de *A.baumannii* IPM-R\*.



**Legenda:** AMI, amicacina; SAM, ampicilina/sulbactam; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; CIP, ciprofloxacina; IPM, imipenem; MEM, meropenem; TZP, piperacilina/tazobactam, SXT, trimetoprim-sulfametoxazole  
S-sensível, R- Resistente.

\*Nesta análise, intermediários foram considerados resistentes.

A CIM para imipenem e meropenem realizada através do E-test para os 110 isolados resistentes ao imipenem mostrou que todos os isolados foram resistentes ( $MIC > 32 \mu\text{g/ml}$ ) com exceção de um isolado que apresentou CIM de  $1.0 \mu\text{g/ml}$  para o meropenem. Todos os isolados foram susceptíveis à polimixina B (MICs de  $<0.25$  a  $2.0 \mu\text{g/ml}$ ) com  $MIC_{50} = 1.0 \mu\text{g/ml}$  e  $MIC_{90} = 2.0 \mu\text{g/ml}$ . Os valores de  $MIC_{50}$  e  $MIC_{90}$  para tigeciclina ( $3.0 \mu\text{g/ml}$  e  $4.0 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente) foram encontrados acima dos valores intermediários de *breakpoint* variando de  $1.0 - 4.0 \mu\text{g/ml}$  (Tabela 7).

**Tabela 7.** Susceptibilidade a 12 antimicrobianos dos 110 isolados *A. baumannii* resistentes ao imipenem.

Antimicrobianos	MIC <sub>50</sub> (µg/ml )	MIC <sub>90</sub> (µg/ml )	Disco Difusão em Agar		
			Nº de isolados (%)		
			S	I	R
Amicacina	-	-	15 (13.6)	1 (0.9)	94 (85.5)
Ampicilina/sulbactan	-	-	19(17.3)	22 (20)	69 (62.7)
Aztreonam	-	-	0	1 (0.9)	109(99.1)
Ceftazidima	-	-	0	0	110(100)
Cefepime	-	-	0	1 (0.9)	109(99.1)
Ciprofloxacina	-	-	0	0	110(100)
Meropenem	-	-	1(0.9)	0	109(99.1)
Piperacilina/Tazobactan	-	-	0	0	110(100)
Trimetoprim- Sulfametoxazol	-	-	2(1.8)	0	108(98.2)
Imipenem	> 32	> 32	NR	NR	NR
Meropenem	> 32	> 32	NR	NR	NR
Tigeciclina	3.0	4.0	NR	NR	NR
Polimixina B	1.0	2.0	NR	NR	NR

**Legenda:** S, susceptível; I, intermediario; R, resistente. NR, não realizado.

A pesquisa fenotípica de carbapenemases através do teste de Hodge modificado (*screening*) mostrou a possível presença dessas enzimas em 97 (88,2%) dos isolados. Na PCR e no sequenciamento do DNA do produto da PCR, 96 isolados (87,2%) foram positivos para a presença do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> e negativos para a presença do gene *bla*<sub>OXA-24</sub> e *bla*<sub>OXA-58</sub>. Todos demonstraram a presença do gene *bla*<sub>OXA-51</sub>. Já as metalo-beta-lactamases IMP, VIM não foram encontradas em quaisquer dos isolados de *A. baumannii*. Quanto à pesquisa de integron de classe 1, também não foi detectada a presença do gene *int1* nos isolados estudados.

O estudo do polimorfismo genético pela técnica de PFGE, identificou entre os isolados resistentes ao imipenem, a ocorrência de 5 genotipos com 65% de similaridade entre eles. Foram utilizados como controle, 7 isolados susceptíveis ao imipenem que apresentaram perfis de fragmentação do DNA diferentes dos isolados resistentes ao imipenem (Figura 4). O genotipo A (71.8% dos isolados, n=79) foi o mais prevalente e estava presente em 7 hospitais. Estes isolados apresentaram elevados percentuais de resistência aos antimicrobianos testados e 95% foram

resistentes aos 7 grupos de antimicrobianos testados. O genótipo B (22.7% dos isolados, n=25) estava presente em 5 hospitais e apresentou resistência a pelo menos cinco diferentes grupos de antimicrobianos testados. Os isolados pertencentes ao genótipo C (3.6% dos isolados, n=4), genótipo D e E (representados por um único isolado) apresentaram resistência a todos grupos de antimicrobianos testados. Foram encontrados isolados produtores de OXA-23 em todos os genótipos: A (n=66, 83.5% dos isolados), B (n=24, 96%), C (n=4, 100%), D (n=1, 100%) e E (n=1, 100%) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Caracterização dos isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem.

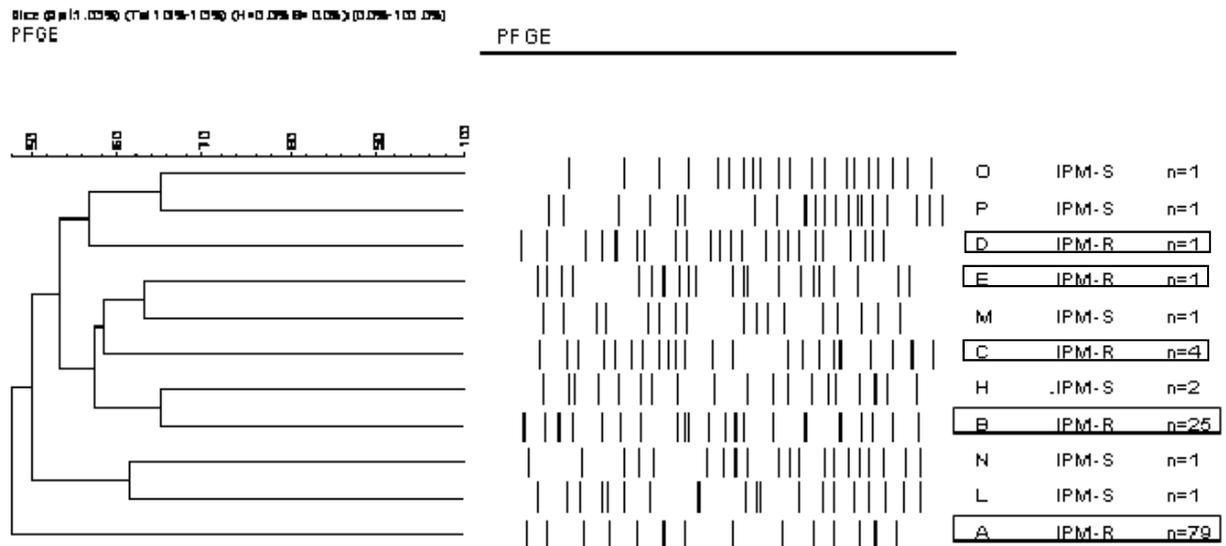
Genótipo	Hospital (n) <sup>a</sup>	Perfil de resistência antimicrobiana (n) <sup>b</sup>	Resistência aos grupos de antimicrobianos n <sup>c</sup> (% de isolados)	Presença de carbapenemase n (%)	Produção de OXA-23 n (%)
A (n=79)	a(17), b(37), c(9), d(1), e(1), g (13), h(1)	AMI,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP,MEM,SXT (n=57)	7 (95)	70 (88.6)	66(83.5)
		AMI,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP,MEM, SXT (n=18)			
		SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, MEM,SXT (n=4)	6 (5)		
B (n=25)	a(6), b(1), c(1), f(1), g(16)	AMI,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP,MEM,SXT (n=13)	7 (56)	22(88)	24(96)
		AMI,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, SXT (n=1)			
		SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, MEM,SXT (n=9)	6 (36)		
		SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, MEM (n=2)	5 (8)		
C (n=4)	b(1), g(3)	AMI,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP,MEM,SXT (n=4)	7 (100)	3(75)	4(100)
D (n=1)	c(1)	AMI,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP,MEM,SXT (n=1)	7 (100)	1(100)	1(100)
E (n=1)	b(1)	AMI,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP,MEM,SXT (n=1)	7 (100)	1(100)	1(100)
Total				97(88.2)	96(87.2)

<sup>a</sup>a-Hospital Barra D'Or, b-Hospital Copa D'Or, c-Hospital Federal de Bonsucesso, d-Hospital da Lagoa, e-Hospital dos Servidores do Estado,f-Hospital Universitário Antônio Pedro,g-Hospital Quinta D'Or, h-Hospital Vita.

<sup>b</sup>nesta análise, isolado com resistência intermediária foi considerado resistente ; AMI, amicacina; SAM, ampicilina/sulbactan; TZP, piperacilina/tazobactan, ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; CIP, ciprofloxacina; MEM, meropenem; SXT, trimetoprim-sulfametoxazole.

<sup>c</sup> grupos de agentes antimicrobianos  
n: número

**Figura 4.** Polimorfismo genético de *A. baumannii* isolados de pacientes atendidos em oito hospitais no Rio de Janeiro, detectado através de eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão do DNA cromossômico com endonuclease de restrição *Apal*



Os 96 isolados de *A. baumannii* produtores do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foram agrupados em 4 genótipos (A, B, C e D) e não apresentaram correlação com os isolados representativos de CRAB pertencentes ao ST92, ST98 e ST103 (dados não mostrados).

Em relação ao estudo através do método de MLST, foram detectados quatro novos STs: ST131, ST132, ST133 e ST134, considerando o MLST-OD (Tabela 9, Figura 5). Quando foi utilizado o MLST-IP, o ST79, ST15 e dois novos perfis alélicos foram detectados. Os SGs identificados foram SG1, SG4 e dois novos perfis. O sequenciamento do gene *bla*<sub>OXA-51-like</sub> revelou a presença do gene *bla*<sub>OXA-66</sub>, *bla*<sub>OXA-95</sub> e *bla*<sub>OXA-132</sub>.

A tabela 9 apresenta a relação entre os genótipos obtidos por PFGE, os STs, tipagem do gene *bla*<sub>OXA-51</sub> e SGs obtidos dos isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23. Nela observamos claramente que 70% dos isolados produtores de OXA-23 pertenciam ao genótipo A, apresentaram o gene *bla*<sub>OXA-66</sub> e estavam disseminados em sete hospitais no período de 2006 à 2007.

**Tabela 9:** Relação entre genótipos por PFGE, STs, tipagem do gene *bla*<sub>OXA-51-like</sub> e SGs obtidos dos isolados clínicos de *A. baumannii* produtores de OXA-23 de acordo com o ano de isolamento.

Ano	Nº de hospitais <sup>a</sup>	PFGE	n <sup>b</sup> (% de isolados)	Sequência baseada em método de tipagem (n=4) <sup>c</sup>					
				MLST-OD <sup>d</sup>		MLST-IP <sup>e</sup>		gene <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	(SG) perfil alélico
				perfil	CC	perfil	CC		
2006-07	7	A	67 (70)	1-15-60-10-28-56-32 (131)	CC113	26-2-2-2-29-4-5 (79)	único	<i>bla</i> <sub>OXA-66</sub>	↓
2006-07	5	B	24 (25)	12-17-72-1-29-67-39 (133)	único	6-6-8-2-3-5-4 (15)	ST15	<i>bla</i> <sub>OXA-132</sub>	↓
2007	2	C	4 (4)	1-12-71-2-1-79-30 (132)	único	3-5-5-5-5-4-8 (novo 1)	único	<i>bla</i> <sub>OXA-95</sub>	novo (SG1 <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> + SG2 <i>ompA</i> e SG2 <i>csrE</i> )
2007	1	D	1 (1)	2-12-73-12-1-9-47 (134)	único	3-1-6-2-4-1-5 (novo 2)	único	<i>bla</i> <sub>OXA-69</sub>	novo (SG2 <i>ompA</i> + SG2 <i>bla</i> <sub>OXA-69</sub> )

<sup>a</sup>Nº de hospitais, número total de hospitais onde cada clone foi identificado.

<sup>b</sup>N, número total de isolados.

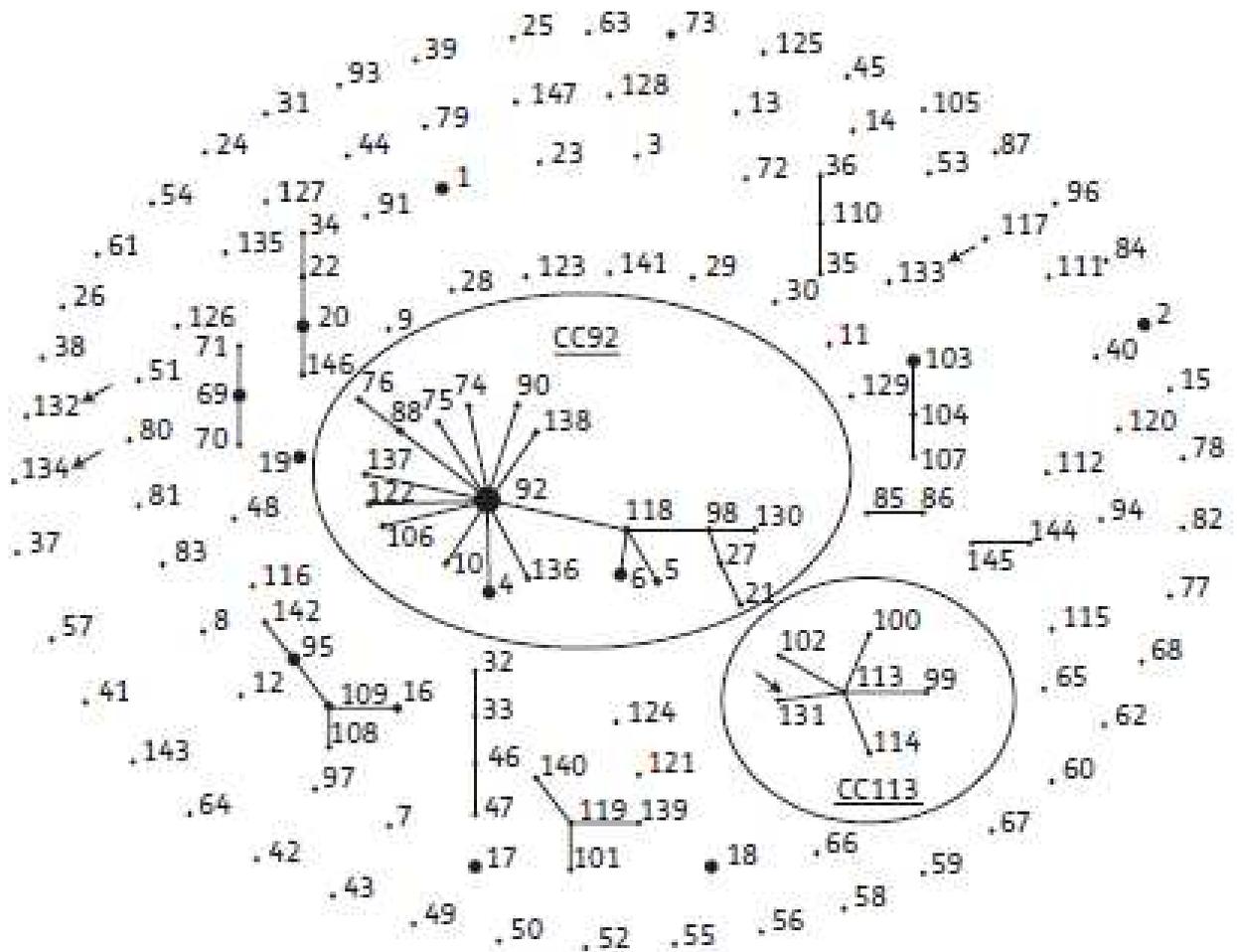
<sup>c</sup> Sequência baseada em método de tipagem realizada com quatro isolados, representativos dos 4 perfis de PFGE.

<sup>d</sup>MLST-OD, esquema de MLST desenvolvido por Bartual et al, 2005.

<sup>e</sup>MLST-IP, esquema de MLST desenvolvido por Nemec et al, 2008.

A Figura 5 apresenta os agrupamentos dos STs (MLST-OD) por e-Burst. Cada ST é representado como um nó (o tamanho relativo de cada nó é indicativo de sua prevalência entre os isolados e as linhas conectam um único locus variante. O CC92 e CC113 são mostrados em círculos. Os STs determinados para os isolados deste estudo estão indicados por setas.

**Figura 5.** Agrupamento dos STs (MLST-OD) do *A. baumannii* por e-Burst, com 185 perfis de MLST representando 304 isolados da base de dados (<http://pubmlst.org/abaumannii/>; 30 Junho 2010, último acesso).



Com relação aos 31 isolados de *A. baumannii* sensíveis ao imipenem, quatro apresentaram resistência ou foram intermediários ao aztreonam, ceftazidima, cefepime e ciprofloxacina, ao passo que três isolados foram susceptíveis a ampicilina-sulbactam e amicacina. Todos os 31 isolados foram susceptíveis à polimixina B (CIM  $\leq$  1  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 10).

Na PCR para o gene *bla*<sub>OXA-23</sub>, 5 isolados foram positivos para o gene *bla*<sub>OXA-23</sub>. A sequência de inserção *ISAb1* foi detectada nestes isolados. Contudo, a associação desta sequência ao gene *bla*<sub>OXA-23-like</sub> foi detectada apenas nos isolados resistentes ao imipenem utilizados como controle e não nos sensíveis. A sequência de inserção *ISAb4* não foi encontrada em nenhum isolado. A sensibilidade ao imipenem (IPM) e meropenem (MEM) foi confirmada através do E-test com CIM  $\leq$  4  $\mu\text{g/mL}$  para ambos antimicrobianos (Tabela 10).

**Tabela 10.** Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos 5 isolados sensíveis ao imipenem, produtores de OXA-23.

Isolado	CIM (mg/L)						Disco Difusão em Ágar					
	IPM	MEM	PB	AK	SAM	TZP	ATM	CAZ	FEP	CIP	MEM	SXT
330M	0,75	1,0	0,50	S	S	S	S	S	S	S	S	R
55LGB	1,5	8,0	0,50	R	I	S	R	R	R	R	I	R
123LGB	4,0	3,0	1,0	S	S	R	R	R	R	R	S	S
141LGB	0,5	0,75	1,0	R	R	I	R	R	R	R	S	R
217LGB	1,5	2,0	0,50	S	S	R	R	R	I	R	S	R

S-sensível; I, intermediário; R- Resistente, TGC: tigeciclina; PB: polimixina B; AMI, amicacina; SAM, ampicilina/sulbactam; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; CIP, ciprofloxacina; IPM, imipenem; MEM, meropenem; TZP, piperacilina/tazobactam, SXT, trimetoprim-sulfametoxazole.

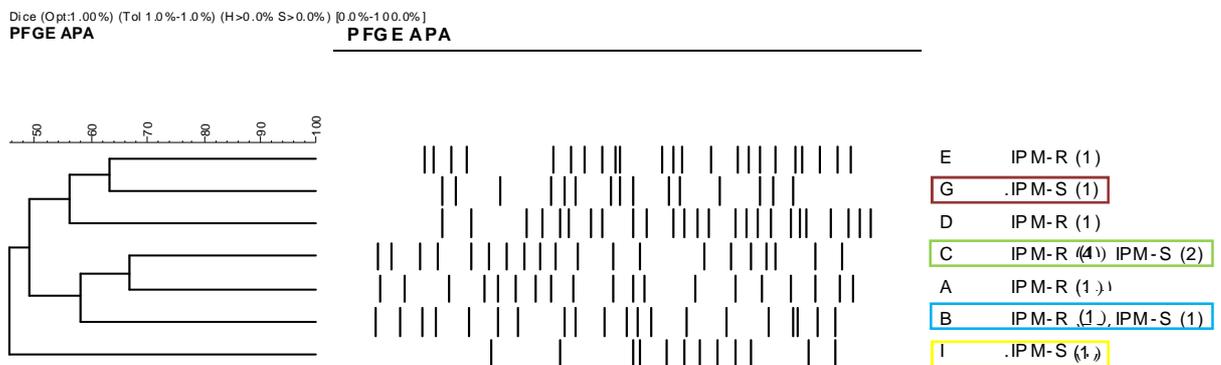
Na avaliação do polimorfismo genético, os 31 isolados sensíveis ao imipenem foram agrupados em 12 genótipos distintos (Tabela 11). Os isolados *bla*<sub>OXA-23</sub>-positivos sensíveis ao imipenem foram agrupados em 4 genótipos distintos (B, C, G and I) segundo o critério de Tenover (Tenover, 1995) (Figura 6). Dois isolados mostraram-se geneticamente relacionados (Genótipo C) e os outros dois apresentaram perfis distintos (I e G) e dois isolados apresentaram perfis de fragmentação do DNA encontrados entre os isolados resistentes (B e C) descritos previamente

(CARVALHO et al, 2009). Exceto para o genótipo I, todos os outros foram detectados entre os isolados *bla*<sub>OXA-23</sub>-negativos.

**Tabela 11.** Caracterização dos 31 isolados de *A. baumannii* sensíveis ao imipenem produtores ou não de OXA-23.

Genótipos	Isolados produtores de OXA-23 / n (%)	Isolados não produtores de OXA-23 / n (%)
	IPM-S	IPM-S
A (n=81)	-	2 (2,47)
B (n=29)	1 (3,45)	3 (10,35)
C (n=13)	2 (15,38)	7 (53,85)
F (n=2)	-	2(100)
G (n=2)	1(50)	1(50)
H (n=2)	-	2(100)
I (n=1)	1(100)	-
K (n=1)	-	1(100)
L (n=2)	-	2(100)
M (n=1)	-	1(100)
N (n=1)	-	1(100)
O (n=1)	-	1(100)
P (n=1)	-	1(100)
Q (n=1)	-	1(100)
R (n=1)	-	1(100)
<b>Total</b>	<b>5 (3,55)</b>	<b>26 (18,44)</b>

**Figura 6.** Polimorfismo genético dos isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23 sensíveis e resistentes ao imipenem detectados através de eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão do DNA com enzima de restrição *ApaI*.



Foi realizada a pesquisa de plasmídeos nos 141 isolados de *A. baumannii*. De acordo com análise do perfil plasmídial, a maioria dos isolados apresentou plasmídeo, 83,7% (n=118) com perfis variando de 1 a 4 (Tabela 12), entretanto, não foi possível a detecção em 16,3% (n=23) dos isolados. O perfil 1, representando 63,6% (n=75) dos isolados, foi o mais encontrado, estando em sua maioria nos genótipos prevalentes A (68%, n=51), B (20%, n=15), C (4%, n=3), D (1,3%, n=1) e E (1,3%, n=1) e também nos genótipos sensíveis L, G, R e M (1,3%, n=1, cada). O perfil 2 foi encontrado em 15,3% (n=18) dos isolados, presente nos genótipos A (50%, n=9), B (22,2%, n=4), C (11%, n=2), Q, H e K com (5,6%, n=1) cada. O perfil 3 presente em 11% (n=13), encontrado nos genótipos C (58,3%, n=7), B (33,3%, n=4), H e I com 8,3% (n=1) cada, e finalmente o perfil 4 presente em 10,1% (n=12) dos isolados e encontrado apenas no genótipo A (100%, n=12) (Tabela 12).

**Tabela 12.** Perfil plasmídial dos 141 isolados de *A. baumannii* distribuído entre os genótipos encontrados.

Genótipos	Perfil plasmídial % isolados (N)				
	Perfil 1	Perfil 2	Perfil 3	Perfil 4	ND
A	68 (51)	50 (9)	-	100 (12)	39 (9)
B	20 (15)	22,2 (4)	33,3 (4)	-	26 (6)
C	4 (3)	11 (2)	58,3 (7)	-	4,3 (1)
D	1,3 (1)	-	-	-	-
E	1,3 (1)	-	-	-	-
F	-	-	-	-	8,6 (2)
G	1,3 (1)	-	-	-	4,3 (1)
H	-	5,6 (1)	8,3 (1)	-	-
I	-	-	8,3 (1)	-	-
K	-	5,6 (1)	-	-	-
L	1,3 (1)	-	-	-	4,3 (1)
M	1,3 (1)	-	-	-	-
N	-	-	-	-	4,3 (1)
O	-	-	-	-	4,3 (1)
P	-	-	-	-	4,3 (1)
Q	-	5,6 (1)	-	-	-
R	1,3 (1)	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>63,6 (75)</b>	<b>15,3 (18)</b>	<b>11(13)</b>	<b>10,1(12)</b>	<b>16,3(23)</b>

ND: Não determinado; N: número de isolados.

No estudo para avaliação da formação de biofilme, a média da DO dos 141 isolados estudados foi de 0,597 e variou de 0,069 a 1,99. O ponto de corte da DO para o teste foi definido como a DO do controle negativo (DOc) que foi de 0,088,

neste estudo. A formação de biofilme dos isolados foi agrupada em não produtor (DO <0,088), fraco (0,088 - 0,176), moderado (0,177 - 0,352) e forte (> 352).

A maioria dos 141 isolados estudados foram produtores de biofilme (96,5%, n=136), sendo 67,4% (n=95) fortes produtores de biofilme, 14,9% (n=21) moderados e 14,2% (n=20) fracos (Tabela 8). Apenas 3,5% (n=5) dos isolados não produziram biofilme (Tabela 13).

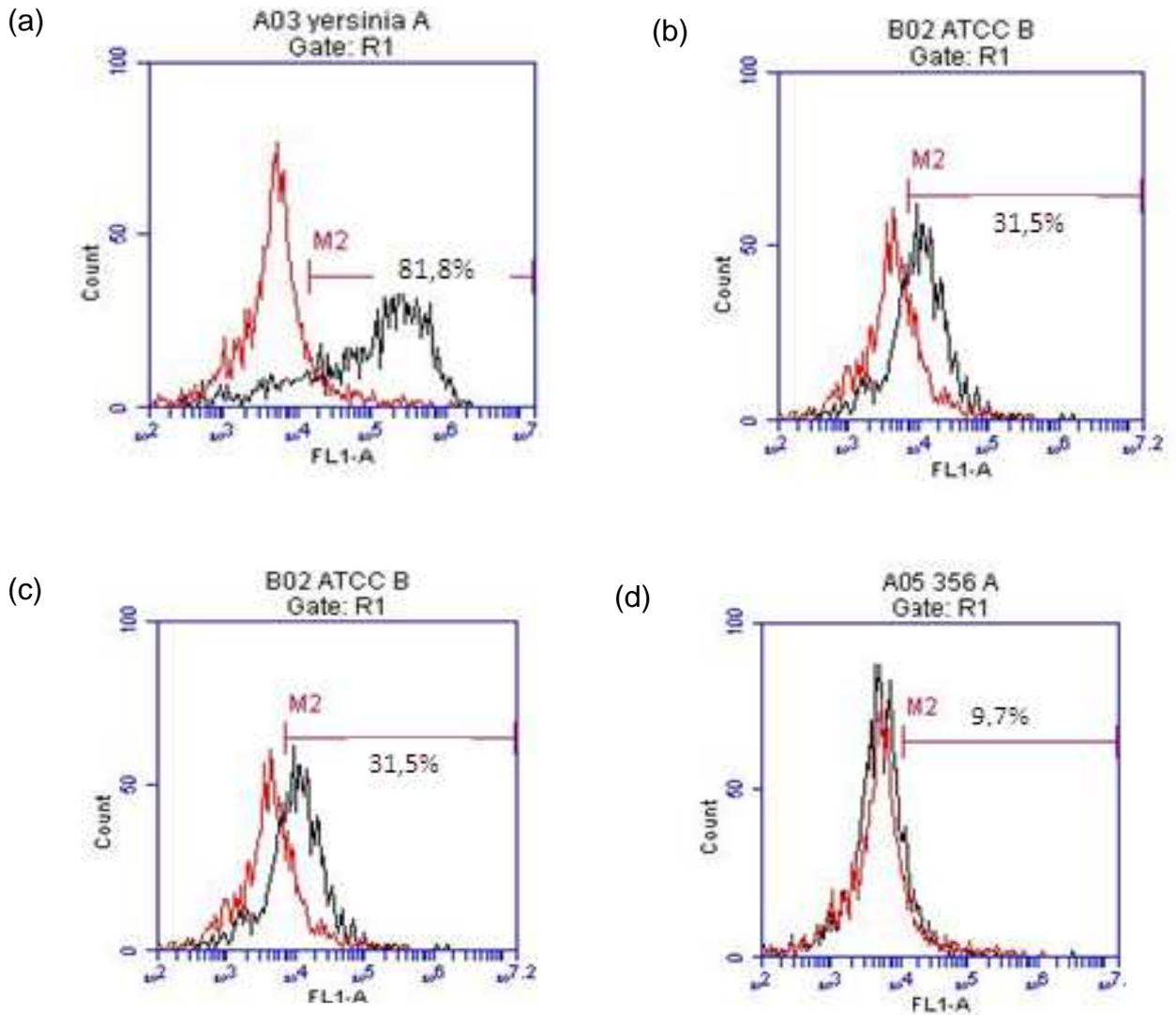
A maioria dos isolados resistentes ao imipenem foi produtor de biofilme (95%, n=105) com a presença de todos os genótipos tipados por PFGE. Entretanto, todos os isolados do estudo que não produziram biofilme (3,5%, n=5) eram resistentes ao imipenem e pertenciam apenas ao genótipo B.

**Tabela 13.** Formação de biofilme dos 141 isolados de *A.baumannii*.

<b>Produção de Biofilme (Variação da DO)</b>	<b>No. cepas / Percentual (%)</b>
Fraco (0,088-0,176)	20 (14,2)
Moderado (0.177-0,352)	21 (14,9)
Forte (>0,352)	95 (67,4)
<b>Total (n=141)</b>	<b>136 (96,5)</b>

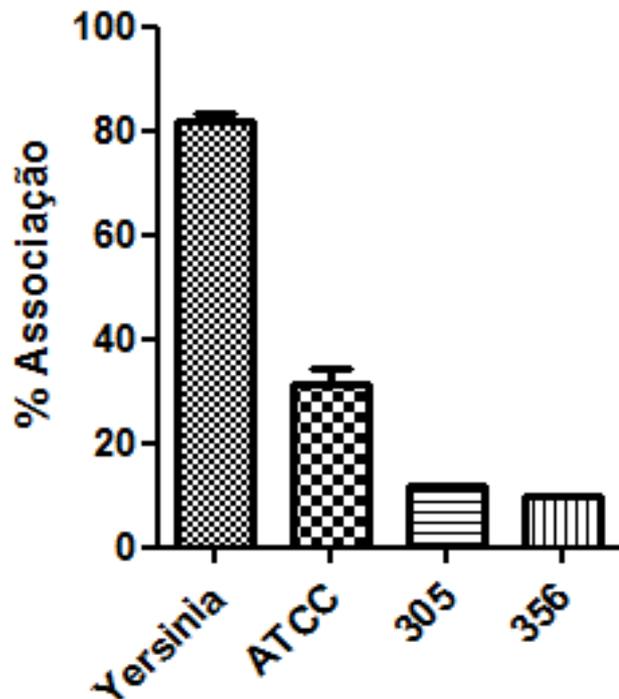
Na avaliação do grau de associação de *A. baumannii* às células epiteliais alveolares (A-549) por Citometria de Fluxo, a taxa de associação, ou seja, a porcentagem de bactérias aderidas ou internalizadas foram: *A. baumannii* ATCC 19606 (31,5%), 305 LGB (11,9%), 356 LGB (9,7%) e *Yersinia enterocolitica* (81,8%) (Figura 7 e 8).

**Figura 7.** Histograma com percentual representativo de células não infectadas por células associadas a *A. baumannii* coradas com corante verde PKH-2 (Sigma) com 2 horas de infecção (n=2). (a) *Yersinia enterocolítica*, (b) *A. baumannii* ATCC 19606, (c) 305 LGB, (d) 356 LGB.



LEGENDA: — Controle das células coradas com PKH2 não infectadas  
 — Células coradas infectadas com *A. baumannii*

**Figura 8.** Taxa de associação de *A. baumannii* com células epiteliais alveolares com 2 horas de infecção (n=3).



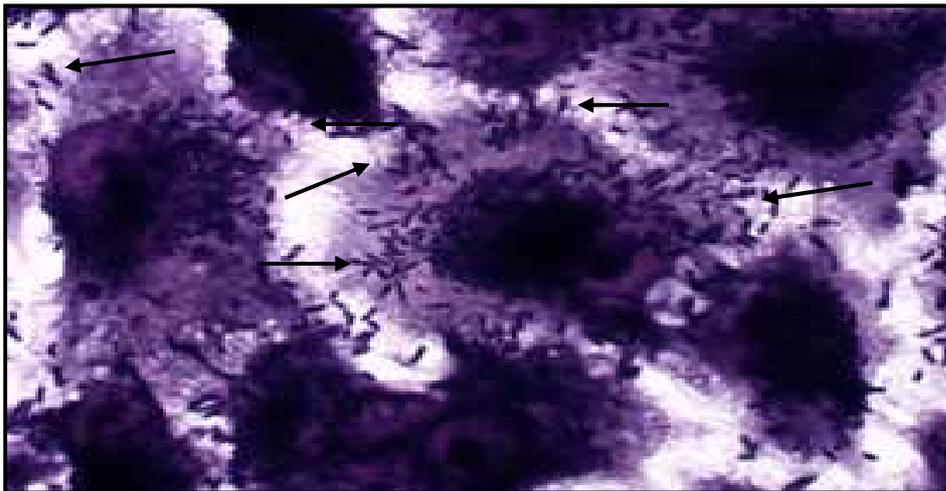
Através da visualização dos diferentes isolados no microscópio ótico, foi observada apenas a aderência dispersa na superfície da célula, pois em nenhum caso verificamos a aderência em áreas localizadas da célula formando microcolônias. Observamos também, pouca bactéria aderidas por célula A-549 entre os isolados estudados, não havendo diferença significativa entre eles, exceto para a *Yersinia enterocolitica*, que foi utilizada como controle positivo (Figura 9).

**Figura 9.** Células A-549 infectadas por 2h com *A. baumannii*, fotografadas no microscópio óptico com lente de imersão em um aumento de 1000x. (a) *A. baumannii* ATCC19606, (b) *Yersinia enterocolitica*, (c) 305 LGB, (d) 356 LGB. As setas indicam as células bacterianas.

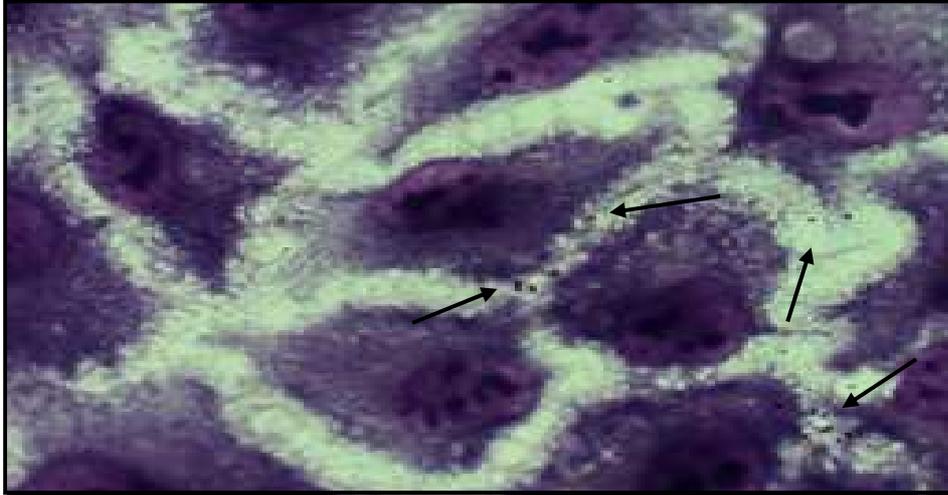
(a)



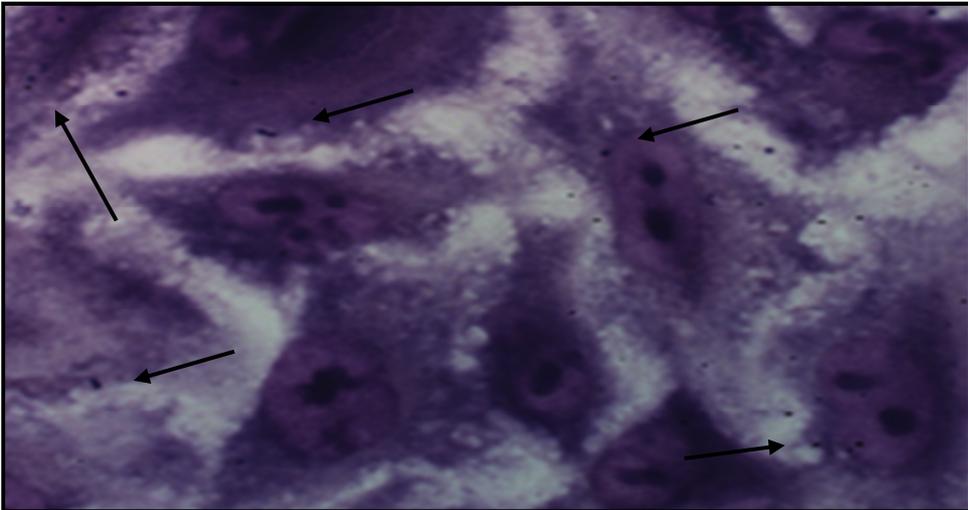
(b)



(c)



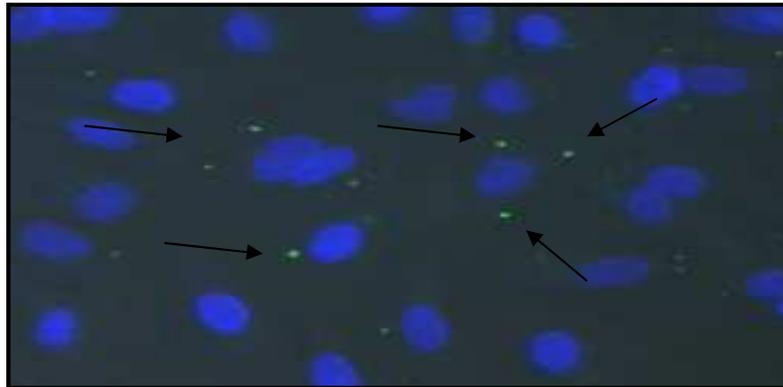
(d)



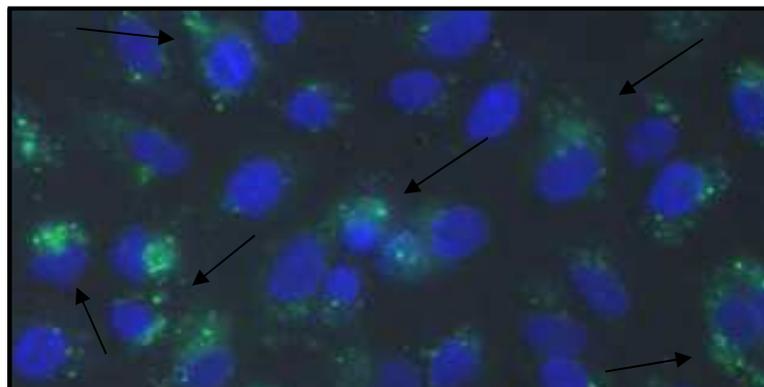
Na microscopia de fluorescência, foi possível a visualização de algumas células infectadas e mais uma vez observamos um baixo porcentual de associação entre os isolados estudados, exceto para *Y. enterocolítica* (Figura 10).

**Figura 10.** Células A-549 infectada por 2h com *A. baumannii* marcadas com corante fluorescente PKH-2 fotografada no microscópio de fluorescência com lente de imersão (Nikon Eclipse E400) em um aumento de 1000x. (a) *A. baumannii* ATCC19606, (b) *Yersinia enterocolítica*, (c) 305 LGB e (d) 356 LGB. As setas indicam as células bacterianas.

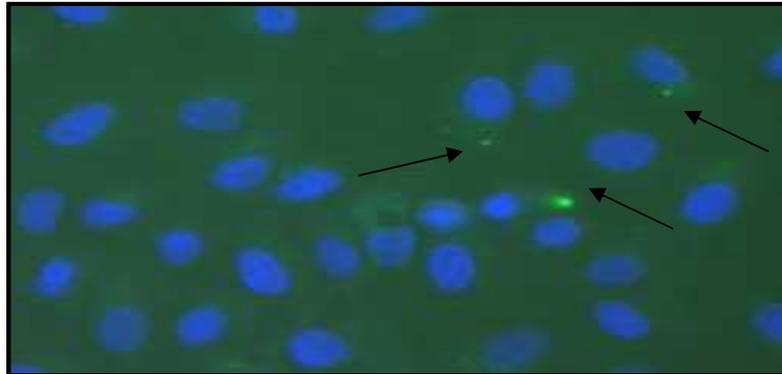
(a)



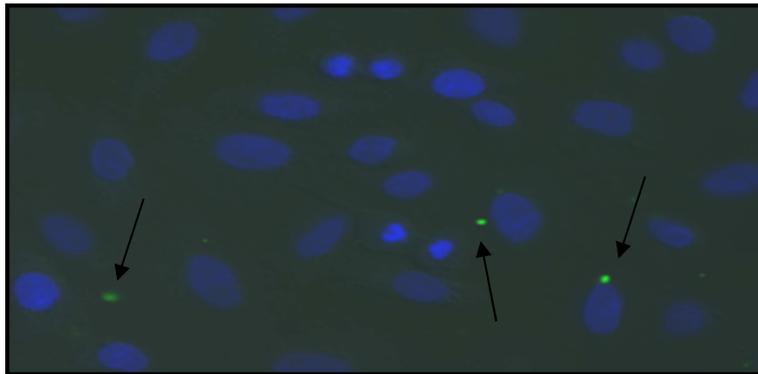
(b)



(c)



(d)



A produção de acil-homoserina-lactonas (AHL) foi avaliada utilizando-se o bioensaio com a cepa *Agrobacterium tumefaciens* (cepa NT1) empregada como biosensor. Entretanto, o ensaio fenotípico utilizando os extratos do sobrenadante dos isolados de *A. baumannii* representativos do genótipo A (305LGB), genótipo B (356LGB) e cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606 foi negativo para a produção de AHL utilizando a cepa indutora NT1. Enquanto o extrato do sobrenadante do controle positivo de *P. aeruginosa* PAO1 e os padrões de referência AHL-C8 e AHL-C12 foram positivos.

## 6 DISCUSSÃO

*Acinetobacter*, que até as últimas décadas era considerado um microrganismo de patogenicidade questionável, tem emergido como um importante agente causador de infecção hospitalar no mundo (MUNOZ-PRICE, 2008). Foi observado um aumento da prevalência em infecções nosocomiais em diversos sítios, onde o impacto clínico dessas infecções foi facilmente percebido, já que os pacientes ficam mais tempo hospitalizados utilizando antimicrobianos de amplo espectro e muitas vezes em unidades de tratamento intensivo (UTIs) (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; LIMA; OLIVEIRA; PAULA, 2008). Este organismo apresenta resistência intrínseca a vários antibióticos, assim como a facilidade em acumular mecanismos de resistência e habilidade de sobreviver por longos períodos em superfícies inanimadas (JOLY-GUILLOU, 2005). Por este motivo, a determinação de sua presença no ambiente hospitalar bem como seus mecanismos de resistência e virulência são de grande importância, já que o mesmo está associado a diversos surtos no Brasil e no mundo (LEVIN et al 1996; VAN DEN BROEK et al, 2006; YOUNG; SABEL; PRICE, 2007; VALENZUELA et al, 2007; VALENTINE et al, 2008).

Este trabalho abordou algumas questões com relação à resistência antimicrobiana, polimorfismo genético, MLST e alguns mecanismos de virulência em isolados de *A. baumannii* coletados por um período de 2 anos. No desenrolar dos trabalhos, os resultados mais importantes foram organizados no formato de três artigos (3 publicados e 1 a ser submetido), ainda que vinculados entre eles.

Inicialmente, foram estudados 110 *A. baumannii* resistentes ao imipenem, gerando o artigo "Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*<sub>OXA-23</sub> collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil" publicado na revista *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009 Jul;34(1):25-8, onde foi possível verificar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, pesquisar fenotipicamente e molecularmente a presença de oxacilinas e metalo-beta-lactamases e, avaliar o polimorfismo genético (Apêndice F).

*A. baumannii* tem sido comumente relatado como resistente a múltiplas drogas e tem mostrado resistência a todas as classes de antibiótico existentes (PEREZ et al, 2007). As taxas de resistência ao imipenem, meropenem, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina e gentamicina na América Latina parecem estar entre as maiores do mundo (UNAL; RODRIGUEZ GARCIA, 2005). Em estudo

realizado com 54.731 amostras pelo programa de vigilância SENTRY, isoladas entre 2001 e 2004, observou-se que aquelas originárias da América Latina apresentaram as maiores percentuais de resistência à amicacina, ciprofloxacina e às cefalosporinas de amplo espectro (GALES; JONES; SADER, 2006). Segundo dados do SENTRY – Programa de Vigilância Antimicrobiana envolvendo a América Latina, as taxas de resistência ao imipenem para *Acinetobacter spp.* passaram de 6,4%, 12,6% e 0,0% no período de 1997-1999 para 84,9%, 71,4% e 50,0% de 2008-2010 na Argentina, Brasil e Chile, respectivamente (GALES et al, 2012). *A. baumannii* MDR também já foi relatado em alguns países da América do Sul, como Argentina e Colômbia (VILLEGAS et al, 2007; FIORILLI et al, 2010).

Nosso estudo revelou altos níveis de resistência à maioria dos antimicrobianos clinicamente disponíveis para o tratamento de infecções por *A. baumannii*, exceto para a polimixina e tigeciclina. Este último antimicrobiano, apesar de sensível, apresentou valores elevados de CIM, entretanto, este fato tem sido descrito em isolados de *A. baumannii* multirresistentes, sugerindo sua limitada utilização clínica no tratamento de infecções envolvendo estes agentes (NAVON-VENEZIA; LEAVITT; CARMELI, 2007; PELEG et al, 2007). Considerando-se multirresistentes os isolados resistentes a três ou mais grupos de antimicrobianos, todos os isolados de *A. baumannii* estudados se encaixam na definição, já que exibiram resistência a pelo menos cinco das sete classes de antimicrobianos testados que foram os carbapenemas, fluoroquinolonas, cefalosporinas, aminoglicosídeo, monobactâmicos, beta-lactâmicos associados a inibidor de beta-lactamases e sulfamidas.

Alguns estudos mostram percentuais de sensibilidade superiores quando comparado ao nosso trabalho. De acordo com o programa SENTRY, no período de 2001-2004, a sensibilidade do *A.baumannii* ao imipenem foi de 89% na América do Norte, 74% na Europa e Ásia e de 86% na América Latina (GALES; JONES; SADER, 2006). De acordo com os resultados do CNISP (“Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program”), dos 331 isolados de *A. baumannii* coletados durante um ano (2009 a 2010) em 20 centros médicos no Canadá, 2,7% dos isolados apresentaram resistência aos carbapenemas, entretanto observou-se resistência a pelo menos seis diferentes classes de antimicrobianos, com um isolado resistente à tigeciclina ( $\geq 8$  mg / L) (MATASEJE et al, 2011).

No Brasil, um estudo conduzido em Londrina, investigou o perfil de susceptibilidade antimicrobiano, e a epidemiologia molecular de 150 isolados de *A. baumannii* coletados de pacientes e do ambiente hospitalar, em dois períodos diferentes onde foi detectado um aumento da resistência aos carbapenemas de 2% (1994-1996) para 73% (2004-2007) (VIANA et al, 2011). Comparando nossos resultados com o último período investigado, verificamos altos níveis de resistência a estes antimicrobianos em ambos os trabalhos: imipenem (73% vs 100%), meropenem (73% vs 99,1%), piperacilina / tazobactam (85% vs 100%), ciprofloxacina (94% vs 100%), ceftazidima (92% vs 100%), cefepime (94% vs 99,1%), amicacina (82% vs 85,5%) e ampicilina / sulbactam (90% vs 62,7%). Assim como em nosso estudo, a polimixina B e tigeciclina foram os únicos antibióticos testados que demonstraram eficácia frente a *A. baumannii* (VIANA et al, 2011).

Os carbapenêmicos estão entre as drogas de escolha para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, porém, o aumento do número de relatos da crescente resistência desta bactéria a estes antimicrobianos, tem se tornado uma grande preocupação na comunidade médica (PEREZ et al, 2007; NICASIO; KUTI; NICOLAU, 2008). Na população de amostras estudadas nesse trabalho, pudemos notar que a resistência aos carbapenêmicos mediada pela enzima OXA-23 foi a encontrada na maioria dos isolados, corroborando com diversos relatos de surtos por *A. baumannii* que apresentam este mecanismo de resistência, provavelmente por uma maior capacidade de transferência horizontal de elementos genéticos móveis contendo o gene codificador de OXA-23.

Como *screening* da atividade de carbapenemases, o Teste de Hodge Modificado (THM) pode, também, ser aplicado na rotina de laboratórios de microbiologia (LEE, K. et al, 2011). Entretanto, apesar de ser um método simples para o rastreamento da produção de carbapenemases e ter mostrado boa correlação com a PCR, apresentou resultados falso-negativo para alguns isolados produtores de OXA-23, assim como já demonstrado em outros estudos (LEE, K. et al, 2003, CARVALHAES et al, 2010).

É possível que a suscetibilidade reduzida a carbapenêmicos nos isolados não produtores da carbapenemase OXA-23 seja mediado pelo gene *bla*<sub>OXA-51</sub>. Este gene normalmente é pouco expresso, porém, a presença da sequência de inserção /SAb1 ou /SAb9 necessária para o aumento de sua expressão, associada a outros mecanismos, como alteração de permeabilidade da membrana ou hiperexpressão

de bombas de efluxo podem conferir resistência aos carbapenêmicos (FIGUEIREDO, S. et al, 2009a; 2009b; TURTON et al, 2006b). No entanto, a detecção deste gene foi utilizada somente para a identificação de *A. baumannii* e sua associação a sequências de inserção não foi avaliada.

A enzima OXA-23 foi a primeira descrita em *A. baumannii* e atualmente contribui para a resistência aos carbapenêmicos mundialmente, com relatos na África (CORVEC et al, 2007), Europa (MARQUE et al, 2005), Oceania (VALENZUELA et al, 2007), Ásia (JEON, B.C. et al, 2005), China (ZHOU, H. et al, 2007), Tailândia (NIUMSUP et al, 2009), Bulgária (STOEVA et al, 2009), Londres e Inglaterra (COELHO, 2006), Colômbia (VILLEGAS 2007) e América do Sul (DALLA-COSTA et al, 2003; MARTINS et al, 2009; SCHMITH-BIER et al, 2010).

Comparando a presença do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> em nosso estudo (96%), com os resultados encontrados por outros estudos fora do Brasil, observamos alguns valores menores, como 21,1% em Taiwan, 40% na Itália e outros mais próximos, como 72,4% na Grécia, 84,6% na Romênia, 82% na Tunísia (LEE, M.H. et al, 2012; MAMMINA et al, 2011; LIAKOPOULOS et al, 2012; BONNIN et al, 2011b; HAMMAMI et al, 2011). Em 2012, dois trabalhos, um deles conduzido na China e outro no Irã, investigando a presença dos genes de carbapenemase em isolados de *A. baumannii* multirresistentes e resistentes ao imipenem (respectivamente), os outros verificaram que, 100% dos isolados foram produtores do gene *bla*<sub>OXA-23</sub>, sendo considerado um dos mecanismos responsáveis pela resistência aos carbapenemas nestes isolados (JIANG et al, 2012; PEYMANI et al, 2012).

No Brasil, a primeira descrição de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos foi em 2003 com oito isolados produtores de OXA-23 (DALLA-COSTA et al, 2003). O segundo relato foi descrito na literatura apenas em 2009, por nosso grupo de pesquisa e referente ao primeiro artigo publicado por Carvalho e colaboradores (2009) (Apêndice F). No ano de 2011, em Porto Alegre, o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foi detectado em 62% dos isolados, e dentre estes, 98% foram resistentes aos carbapenemas (FERREIRA et al, 2011). Estudo realizado em São Paulo, avaliando infecções da corrente sanguínea por *A. baumannii* em um Hospital Universitário mostrou que das 29 linhagens resistentes a carbapenêmicos detectadas em pacientes de uma UTI, 21 (72,4%) delas foram positivas para a enzima OXA-23 (FURTADO et al 2011). No ano seguinte, outro estudo realizado em Porto Alegre que avaliou dados clínicos e epidemiológicos de infecções por *A. baumannii*

multirresistentes durante 12 meses nos hospitais locais, identificou a presença deste gene em 99% dos isolados (MARTINS et al, 2011).

Ferramentas para o estudo da similaridade genética de agentes etiológicos são de fundamental importância para a compreensão da epidemiologia das doenças infecciosas, tais ferramentas possibilitam a caracterização de surtos, fatores associados à IRAS e situações de contaminação cruzada que auxiliam no monitoramento e controle da infecção hospitalar (SINGH et al, 2006).

Apesar de muitos estudos já terem descrito diversos casos de *A. baumannii* resistentes a carbapenemas no Brasil, nas regiões Sul e Sudeste: no Paraná, em São Paulo, em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul, até o momento, não há estudos que avaliem a existência de clones disseminados no país. Foram descritas as enzimas OXA-72 e OXA-143 no Estado de São Paulo, entretanto a carbapenemase predominante encontrada é a OXA-23. Em nosso estudo, no Rio de Janeiro, na avaliação do polimorfismo genético através de PFGE dos isolados, identificamos a ocorrência de 5 grupos clonais (A, B, C, D e E) e dentre eles, existem dois clones (A e B) prevalentes circulando entre diversos hospitais públicos e privados, que também foram detectados no Hospital Universitário Pedro Ernesto da UERJ em um surto ocorrido entre 2007 e 2008 (SILVA, 2010). Este resultado indica uma disseminação de CRAb inter-hospitalar, fato já descrito em outros trabalhos (KARAGEORPOLOUS et al, 2008; VAN DEN BROEK et al, 2009; VALENZUELA et al, 2007).

A disseminação de CRAb inter-hospitalar pode estar associada à transferência de pacientes que estejam infectados ou colonizados e também por dividirem o mesmo espaço no hospital. Este fato já foi relatado previamente em países como a Inglaterra, França, Estados Unidos, Colômbia e Holanda, (VAN DEN BROEK et al, 2006; COELHO et al, 2006; VILLEGAS et al, 2007; FONTANA et al, 2008; LANDMANN et al, 2009).

A ocorrência de genótipos comuns entre isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23 em diferentes hospitais no Rio de Janeiro sugere que a disseminação destes contribui para o aumento da resistência ao imipenem entre *A. baumannii*. A dinâmica da disseminação de Crab entre os diferentes hospitais não foi investigada no presente estudo. Essas cepas podem ter surgido, ao longo do tempo, a partir de um ancestral comum que por sua habilidade de adquirir resistência aos antimicrobianos e plasticidade genética podem ter gerado diferentes genótipos

(VALENZUELA et al, 2007; IMPERI et al, 2011) Desta maneira, a presença de isolados multirresistentes de *A. baumannii* produtores de OXA-23 em diferentes hospitais reforça a necessidade do controle do uso de carbapenemas e a prevenção da disseminação desses organismos no Rio de Janeiro.

Nesta segunda parte do estudo, investigamos a estrutura populacional dos 96 isolados clínicos de *A. baumannii* produtores do gene *bla*<sub>OXA-23</sub>. Este estudo foi realizado em colaboração com a Dra. Luísa Peixe do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade no Porto e Portugal, onde os resultados deram origem ao segundo artigo: "OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro?" publicado na revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011; (66):62-65 (Apêndice G). Nesta análise incluímos diversos métodos de tipagem genética, como dois esquemas de MLST, determinação da sequência do grupo (SG) e sequenciamento do gene *bla*<sub>OXA-51</sub>. Também avaliamos o contexto genético do gene *bla*<sub>OXA-23</sub>.

Existem três clones epidêmicos de *A. baumannii*, comumente referidos como clones internacionais ou clones Europeus (Clone Europeu I, II e III - EUI, EUII, EUIII), que tem predominado em diversos países da Europa desde 1990 (Dijkshoorn, 1996 A). Estas linhagens clonais correspondentes ao Complexo Clonal 1, 2 e 3 respectivamente (CC1, CC2 e CC3), são responsáveis por surtos hospitalares e têm sido identificadas por todo o mundo (HIGGINS et al, 2010; VAN DESSEL et al, 2004 A; MINANDRINI et al, 2011; SUNG, 2012; CARRETTO et al, 2011; NEMEC et al, 2008; MUGNIER et al, 2010). Dentre estes clones, destaca-se o EUII, que é conhecido como um clone de *A. baumannii* multirresistente disseminado mundialmente, sendo encontrado na Espanha, Portugal, África do Sul, França, Grécia, Turquia e República Checa (VAN DESSEL et al, 2004). Recentemente, foi relatado o surgimento de CRAB pertencente ao EUII na República Checa, Itália e Alemanha (NEMEC et al, 2008; D'AREZZO et al, 2009; KOHLENBERG et al, 2009). Além disso, a ocorrência de *A. baumannii* MDR geneticamente relacionado com este clone foi descrita em um Centro médico do Exército nos Estados Unidos e em outra instalação de tratamento militar (HUJER et al, 2006; WHITMAN et al, 2008).

Estudos de MLST referentes a diversidade clonal de isolados de *A. baumannii* carreadores do gene *bla*<sub>OXA-23</sub>, revelaram sua associação principalmente com o *sequence type* (ST) 92 (formalmente designado ST22) e com o EUII (Fu Y, 2010; Mugnier pd, 2010). O ST2, específico para o EUII (DIANCOURT, 2010),

também tem sido descrito como sendo o ST mais comum em países do mediterrâneo e recentemente foi descrito na Itália (DA SILVA et al, 2006; DI POPOLO et al, 2010; GIANNOULI et al, 2009).

Em nosso estudo, embora todos os isolados sejam carreadores do gene *bla*<sub>OXA-23</sub>, foram encontrados quatro novos STs que não tiveram relação com os produtores de ST92/OXA-23 (MLST-OD) mundialmente predominantes, descritos em diversos países da Europa, Coreia e China (FU et al, 2010; MUGNIER et al, 2010).

O genótipo A (70% dos isolados produtores de OXA-23, encontrado em 7 hospitais) foi atribuído ao ST131 (MLST-OD), ST79(MLST-IP) e SG1, e apresentou o gene *bla*<sub>OXA-66</sub>. O ST131 pertence ao CC113, que inclui STs encontrados na Argentina. Embora pertencente ao SG1 (EU-II), o ST79 não é estreitamente relacionado com o CC2 ou ST15. Essas linhagens foram descritas recentemente disseminadas como clusters clonais que incluem a maioria dos isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenemas (DIANCOURT et al, 2010).

O genótipo B (25% dos isolados) foi atribuído ao ST133 (MLST-OD), ST15 (MLST-IP) e SG4, e apresentou o gene *bla*<sub>OXA-132</sub>, relatado previamente apenas na Arábia Saudita e em isolados Portugueses (F. Grosso, S. Quinteira e L. Peixe, resultados não publicados). Vale ressaltar a identificação do ST15 como um clone multirresistente internacional emergente (DIANCOURT et al, 2010) que foi relatado recentemente em outro isolado de *A. baumannii* brasileiro produtor de OXA-23, merece atenção (MUGNIER et al, 2010).

Os isolados representativos do genótipo C (4% dos isolados) pertenceram ao ST132 (MLST-OD), revelaram novos perfis alélicos quando foram aplicados o MLST-IP e a identificação do SG e apresentou o gene *bla*<sub>OXA-95</sub>. Finalmente, o genótipo D (1% dos isolados) foi atribuído ao ST134 (MLST-OD), que também revelou novos perfis alélicos com MLST-IP e identificação do SG e apresentou o gene *bla*<sub>OXA-69</sub>.

Neste estudo foram identificadas quatro linhagens clonais de *A. baumannii* produtoras de OXA-23 não relacionadas causando atualmente infecções em hospitais do Rio de Janeiro. Curiosamente, apesar da diversidade clonal, o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foi constantemente encontrado associado ao transposon *Tn2006* e estava cromossomicamente codificado em todos os isolados (GROSSO et al, 2010).

Mesmo considerando que atualmente os métodos de tipagem baseados nas sequências podem diferir em seu grau intrínseco de robustez, um fator que em

última análise poderia prejudicar seu poder discriminatório, convém destacar que o padrão dos resultados observados foi coerente, independente da metodologia aplicada, sempre apontando a existência de *clusters* congruentes de isolados caracterizados por características muito distintas.

Nossos resultados destacaram claramente o agrupamento da maioria dos isolados produtores de OXA-23 (70%) colectados no Rio de Janeiro com o Clone Europeu II (EU-II) (TURTON et al, 2007; DIANCOURT et al, 2010; TOWNER; LEVI; VLASSIADI, 2007; GONZÁLEZ et al, 2009). Entretanto, a detecção de novos STs, juntamente com novos perfis alélicos determinados pela identificação do SG, sugerem um ponto de diversidade local que vale a pena explorar.

Nesta terceira parte do estudo, passamos a avaliar os 31 isolados de *A. baumannii* sensíveis ao imipenem, gerando o artigo “Occurrence of *bla*<sub>OXA-23</sub> gene in imipenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*”. Neste grupo de isolados, a pesquisa do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foi realizada a fim de investigarmos a possível presença deste gene de carbapenemase não expresso bem como sua associação às sequências de inserção IS*Aba*1 e IS*Aba*4 (Apêndice H).

O gene *bla*<sub>OXA-23</sub> é encontrado principalmente em plasmídeos e tem sido associados com os elementos de inserção IS*Aba*1 ou IS*Aba*4 (CORVEC et al. 2007). Estes elementos, quando localizados adjacentes ao gene *bla*<sub>OXA-23-like</sub> fornecem sequências promotoras que aumentam sua expressão (CORVEC et al. 2007). IS*Aba*1 regula a mobilidade do gene *bla*<sub>OXA-23</sub>, tem duas cópias que flanqueiam o gene de beta-lactamase e formam um transposon composto (definida como Tn2006) (MUGNIER et al. 2010). IS*Aba*4 pertence a família IS982, possui 975 pb de comprimento, duas repetições invertidas de 18-bp e codifica para uma transposase putativa com 292 aminoácidos. Estes elementos de inserção podem estar envolvidos nos processos de transposição na origem da aquisição do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> (CORVEC et al. 2007).

Em nosso estudo, encontramos 5 isolados sensíveis ao imipenem produtores do gene *bla*<sub>OXA-23</sub>. Entretanto, apesar da sequência de inserção IS*Aba*1 ter sido encontrada nestes isolados, sua associação ao gene *bla*<sub>OXA-23-like</sub> não foi detectada, o que justifica a sensibilidade destes isolados ao imipenem. Estas sequências de nucleotídeos do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> e da sequência de inserção IS*Aba*1 foram

depositadas no *GenBank* com números de acesso JF421124 e JF340121, respectivamente.

Genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub> codificados por cromossomos têm sido descritos em isolados de *Acinetobacter radioresistens* sensíveis a carbapenemas, sugerindo que esta espécie é uma fonte destes genes (POIREL et al, 2008; BOO; CROWLEY, 2009; MENDES et al, 2009). Poirel e colaboradores identificaram um plasmídeo semelhante em vários isolados de *A. baumannii* e *A. radioresistens* produtores de *bla*<sub>OXA-23</sub> (POIREL et al, 2008). Estes resultados sugerem que um elemento IS*Aba1* proveniente do *A.baumannii* mediado por plasmídeo pode ter entrado no *A. radioresistens*, ter sido transposto e direcionado para as regiões flanqueadoras dos genes cromossômicos *bla*<sub>OXA-23-like</sub>. Uma estrutura de transposon é então formada, aumentando a expressão dos genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub>. Esta estrutura pode transpor e atingir um plasmídeo dentro do genoma de *A. radioresistens*, e finalmente, este plasmídeo conjugar em *A. baumannii* e disseminar a resistência na última espécie (POIREL et al, 2008).

A presença de isolados sensíveis ao imipenem carreadores do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> e da sequência de inserção IS*Aba1* separadamente alerta para a possibilidade desta sequência se localizar à frente do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> tornando estes isolados resistentes aos carbapenemas. Além disso, a presença deste gene em isolados sensíveis aos carbapenemas destaca a possibilidade de reservatórios não detectados do gene carbapenemase, uma vez que a detecção laboratorial de tais genes e as posteriores medidas de controle de infecções nos hospitais tem geralmente como alvo os organismos resistentes ao imipenem. Por isso, este estudo chama a atenção para a alta prevalência de *bla*<sub>OXA-23</sub> em *A. baumannii* e para participação de isolados sensíveis na disseminação silenciosa deste gene.

Durante este estudo, também foi avaliado o perfil plasmidial dos 141 isolados de *A. baumannii*. A presença de plasmídeo na maioria dos isolados estudados é de grande importância, pois geralmente contém uma origem de transferência de genes que codificam funções que podem ser transferidas por conjugação para novos hospedeiros. Além das funções envolvidas na replicação e transferência, os plasmídios geralmente codificam resistência a antibióticos que é frequentemente derivado da transferência horizontal de genes entre a mesma espécie ou espécies diferentes no ambiente ou em ambientes hospitalares (SMILLIE et al, 2010). Apesar de terem sido encontrados 4 perfis diferentes, não foi encontrado um plasmídeo

específico para isolados resistentes. Entretanto, o perfil 4, parece exclusivo do genótipo A, que é o prevalente. Os resultados obtidos sugerem a necessidade de estudos futuros por hibridização, a fim de se verificar a presença dos genes de resistência ou virulência nos plasmídios encontrados.

O aumento da incidência de infecções por *A. baumannii* multirresistentes em instituições de saúde pode em parte ser atribuído à capacidade deste organismo em causar surtos e de sobreviver em superfícies inanimadas secas durante um tempo prolongado (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; VAN DEN BROEK et al, 2006; MARAGAKIS; PERL, 2008; KARAGEORGOPOULUS, 2008). A maioria dos estudos relataram sua sobrevivência por cerca de 1 mês, apesar dela ter sido observada por até 5 meses (JAWAD et al, 1998; VILLEGAS; HARTSTEIN, 2003; KRAMER A , 2006). Além disso, *A.baumannii* possui mecanismos que facilitam a colonização dos pacientes e de equipamentos usados no atendimento médico. Cepas específicas podem aderir e penetrar em células epiteliais humanas (LEE, H.W. et al, 2008) através de fimbrias ou cadeias laterais de lipopolissacarídeos (KOELEMAN et al, 2001) e desenvolver biofilme em contato com superfícies de plástico ou vidro (LEE, H.W. et al, 2008). A última propriedade pode ser de especial relevância clínica com relação às infecções associadas a cateteres (RODRIGUEZ-BANO et al, 2008).

Finalizamos o estudo, verificando alguns fatores de virulência, como produção de biofilme, aderência em cultura de células e *quorum sensing*, a fim de encontrarmos algum mecanismo que possa ter importante papel na colonização, infecção e propagação epidêmica dos isolados incluídos neste estudo.

Os biofilmes representam sistemas biológicos altamente organizados, onde as bactérias estabelecem comunidades funcionais estruturadas e coordenadas e são normalmente encontrados em substratos sólidos, como equipamentos hospitalares, o que representa grande risco.

A habilidade de nossos isolados em produzir biofilme foi estudada pelo ensaio colorimétrico de cristal violeta, que indiretamente mede o número de células bacterianas baseado na coloração da camada de peptideoglicano. Observou-se que a maioria dos 141 isolados estudados foi produtor de biofilme, subdivididos em fortes, moderados e fracos. Apesar da maioria dos isolados apresentarem multirresistência, 5 não produziram biofilme. Este resultado, também foi verificado por Rao e por Rodriguez-Baño e colaboradores (2008), que em um estudo de

investigação sobre a correlação entre biofilme e multirresistência, com características associadas, além de implicações clínicas, verificaram que alguns isolados não produziram biofilme, apesar de serem multirresistentes (RAO et al, 2008; RODRIGUEZ-BANO et al, 2008).

A maioria dos isolados resistentes ao imipenem foi produtor de biofilme (95%, n=105) com a presença de todos os genótipos tipados por PFGE (A, B, C, D e E). Entretanto, todos os isolados do estudo que não produziram biofilme (3,5%, n=5) eram resistentes ao imipenem e pertenciam apenas ao genótipo B. Nossos resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Rao et al (2008) (RAO et al, 2008), onde a maioria dos isolados multirresistentes formou biofilme e foram encontrados isolados produtores e não produtores de biofilme dentre os resistentes ao imipenem. Os autores também compararam a resistência à amicacina, cefotaxima e ciprofloxacina entre os isolados, e verificaram taxas maiores para estes antimicrobianos nos produtores de biofilme. Já Rodriguez-Bano e colaboradores (2008) verificaram que os produtores de biofilme são frequentemente menos resistentes ao imipenem, ciprofloxacina e parecem ser menos epidêmicos. Entretanto, em nosso estudo, não foi observada nenhuma correlação entre formação de biofilme e susceptibilidade antimicrobiana.

Sechi e colaboradores (SECHI et al, 2004) verificaram que em uma coleção de isolados clínicos de *A.baumannii*, 80% dos isolados formaram biofilme, talvez devido a um clone prevalente. Em nosso estudo, curiosamente, entre os isolados dos genótipos prevalentes A, B e C foram encontrados formadores e não formadores de biofilme. Resultados semelhantes foram encontrados por Rodriguez-Bano e colaboradores (2008), que também encontraram clones relacionados produtores ou não de biofilme, sugerindo que esta é uma característica específica do clone e que sua expressão não varia substancialmente sob diferentes condições, no entanto, mais estudos são necessários para investigar esta hipótese.

Nos isolados sensíveis ao imipenem, todos foram produtores de biofilme. Assim como em nossos resultados, de Breij e colaboradores (2010) observaram que os isolados sensíveis não formaram menos biofilme que os isolados multirresistente. Já Rodriguez-Bano e colaboradores (2008) verificaram que a formação de biofilme foi maior nos isolados sensíveis ao imipenem que nos resistentes (25% vs. 47%).

A formação de biofilme é um importante fator de virulência em diversas infecções nosocomiais, de modo que ocorre em 65% delas (POTERA, 1999). Em nosso estudo, observamos que a maioria dos isolados foram produtores de biofilme. Deste modo, a dificuldade de se erradicar essas bactérias desses locais, aliada a sua multirresistência e outros fatores de virulência contribuem para seu sucesso e sobrevivência tanto no hospedeiro quanto no ambiente hospitalar, tornando-se um grave problema de saúde pública, aumentando a mortalidade dos pacientes hospitalizados.

A maioria dos trabalhos relatados até o momento, analisaram a interação de *A. baumannii* com superfícies abióticas, e pouco se sabe sobre a interação deste patógeno com superfícies bióticas que podem ser relevantes para o entendimento da bactéria. A adesão bacteriana às células epiteliais é uma das etapas essenciais para a colonização e infecção. Deste modo, optamos por avaliar adesão dos dois genótipos prevalentes e da cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606 à monocamada de células. Para este ensaio utilizamos a linhagem celular A-549 de células epiteliais alveolares humana do tipo 2 de pneumócitos, que tem sido utilizada para simular a adesão ao pulmão humano e, como tal, representa um modelo potencial para pneumonia causada por *A.baumannii* (GADDY; TOMARAS; ACTIS, 2009).

A interação de *A. baumannii* a diferentes tipos de células respiratórias humanas já foi demonstrada em alguns estudos, indicando que este patógeno interage com os diferentes componentes do aparelho respiratório humano (LEE, JC et al, 2006; LEE, H.W. et al, 2008). Nossos isolados foram capazes de aderir às células A-549, porém, com baixas taxas de associação, ou seja, baixa porcentagem de bactérias aderidas ou internalizadas por células, não havendo diferença entre os grupos clonais. Apenas a cepa de referência ATCC 19606 apresentou nível um pouco maior de associação às células epiteliais. A visualização através da microscopia óptica e de fluorescência mostrou resultados coerentes com a metodologia anterior, com poucas bactérias aderidas por célula. Apesar da utilização de outro tipo celular, nossos resultados estão de acordo com o estudo de Lee e colaboradores onde a maioria dos isolados clínicos de *A. baumannii* infectou apenas de 20-30% de células NCI-H292 e o número de bactérias aderidas foi de 1-2 bactérias por célula infectada (LEE, J.C. et al, 2006). De Breij e colaboradores (2010) encontraram taxas de adesão de *A. baumannii* a células NCI-H292 após 1

hora de infecção variando de 6-53%, incluindo a cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606 com percentual de 19%.

O estudo de *quorum sensing* na regulação de alguns fatores de virulência, como adesão bacteriana, formação de biofilme, dentre outros, tem permitido uma melhoria na compreensão da patogenicidade bacteriana e na interação parasita-hospedeiro, além de ser um alvo atraente para o desenvolvimento de novas terapias antibacterianas (RASKO et al, 2008; RASKO; SPERANGIO, 2010). Em bactérias Gram negativas, a comunicação celular normalmente é mediada pela produção de moléculas sinalizadoras de N-acil-homoserina lactona (AHL) (FUQUA; WINANS, 1996). Na análise dos genomas de *A. baumannii* foram encontrados genes homólogos ao gene codificador da AHL sintase e ao gene regulador transcricional ligante de autoindutor, sugerindo a produção de moléculas de AHLs (ALTSCHUL et al, 1990). No ano de 2008, o gene *abal* pertencente a família *LuxI* foi identificado e caracterizado como responsável pela síntese do autoindutor do tipo AHLs com comprimento de cadeia variados (NIU, 2008).

A cepa *Agrobacterium tumefaciens* NT1 possui um plasmídeo recombinante cotendo um gene repórter que codifica  $\beta$ -galactosidase e o gene *traR* (homólogo ao *luxR*), que codifica o fator transcricional TraR. Quando há adição exógena de AHLs, a expressão desse plasmídeo é detectada pela clivagem do substrato cromogênico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranoside) pela  $\beta$ -galactosidase (MILLER, 1972). A pesquisa do autoindutor de AHL utilizando a cepa *A. tumefaciens* NT1 não revelou a presença deste indutor nos extratos orgânicos dos sobrenadantes livres de células das culturas obtidas a partir de cada isolado testado, apresentando resultado positivo apenas para a cepa *P. aeruginosa* PAO1 e para os controles de AHL-C8 e AHL-C12. A cepa *P. aeruginosa* PAO1 é controlada por um *quorum sensing* dependente de duas principais moléculas sinalizadoras de AHL, que são N-butanoil-L-homoserina e lactona (C4-HSL) e N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL) (SIO et al, 2006). Por este motivo, podemos prever que o resultado positivo para esta cepa foi devido à presença da AHL-C12, detectável pela cepa indutora da *A. tumefaciens* utilizada. O resultado negativo para a pesquisa de AHL por bioensaios utilizando-se *A. tumefaciens* NT1 pode ser devido à produção de AHLs com modificações estruturais, como substituições ou ramificações ao longo da cadeia de carbono, que não sejam detectadas por esta cepa biosensora, que detecta AHL de 6 a 12 cadeias de carbono, independente da substituição no C3. Em

2008, Niu e colaboradores identificaram AHL-3-OH-C12 nos extratos do sobrenadante de culturas de *A. baumannii*, além de prováveis estruturas que foram AHL-C12, AHL-C10, AHL-C14, AHL-3-oxo-C13 e AHL-C16 (NIU et al, 2008). Gonzales e colaboradores, detectaram no ano seguinte um sinal que pode corresponder a AHL-3-OH-C12 (GONZALES et al, 2009). Estes relatos demonstram a presença de *quorum sensing* em *A.baumannii*, mediado essencialmente por autoindutores do tipo AHL, que apresentaram variações quanto ao tamanho da cadeia de carbono e a presença ou não de substituições, ficando fora do limite de detecção do autoindutor utilizado em nosso estudo, justificando mais uma vez a ausência de resultados positivos com os isolados selecionados para o bioensaio.

Diante do exposto, foi possível verificar que no cenário atual, as infecções causadas por *A. baumannii* representam um grande problema de saúde pública em diversos países, inclusive no Brasil e a disseminação de bactérias multirresistentes está limitando cada vez mais, suas opções terapêuticas (FOURNIER; RICHET, 2006; GIAMARELLOU; ANTONIADOU; KANELLAKOPOULOU, 2008). Por este motivo, devemos ter como meta principal controlar a disseminação da resistência microbiana em serviços de saúde no país, por meio do conhecimento do perfil de resistência microbiana e adoção de medidas de prevenção e controle. Para isso, é necessário reduzir seu aparecimento e prevenir sua expansão demandando um esforço mundial que inclui o uso criterioso dos antibióticos e uma rígida aderência aos princípios do controle de infecção, para assim reduzir respectivamente a pressão seletiva que favorece essas cepas microbianas e a sua transmissão, colonizando e infectando os pacientes internados. Deste modo, estudos similares ao nosso devem ser incentivados com o propósito de informações necessárias ao combate dessas infecções aos órgãos de saúde pública, às comissões de controle de infecção hospitalar e aos profissionais da área de saúde.

## 7 CONCLUSÃO

- Nossos isolados revelaram altos níveis de resistência à maioria dos antimicrobianos, clinicamente disponíveis para o tratamento de infecções por *A. baumannii*; dentre os isolados resistentes ao imipenem, todos foram multirresistentes, com resistência a pelo menos cinco dos sete grupos de antimicrobianos testados.
- A polimixina B e tigeciclina foram os únicos antibióticos testados que demonstraram eficácia contra *A. baumannii*;
- O gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foi detectado em 96 (87,6%) dos isolados de *A.baumannii*, sugerindo que este seja o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos;
- Observou-se diversidade genética entre os isolados resistentes ao imipenem, com ocorrência de 5 grupos clonais (A, B, C, D e E) e prevalência de dois (A e B), circulando entre diversos hospitais públicos e privados; sugerindo que a disseminação destes, por diferentes vias, contribuem para o aumento da resistência a imipenem entre *A. baumannii*;
- Foram detectados 4 principais STs de *A. baumannii* isolados no Rio de Janeiro: ST131/ST79, ST133/ST15, ST132/Novo1, ST134/Novo2, determinados respectivamente pela base de dados de MLST Oxford e pelo Instituto Pasteur;
- Foram encontrados 12 genótipos distintos entre os isolados sensíveis ao imipenem, sendo dois deles (genótipos B e C) encontrados entre os isolados resistentes;
- O gene *bla*<sub>OXA-23</sub> pode ser encontrado mesmo em isolados sensíveis ao imipenem;
- Foram encontrados diferentes perfis plasmidiais, sem nenhum específico para os isolados resistentes;
- Dentre os isolados incluídos no estudo 96,5% foram produtores de biofilme;
- Os isolados selecionados foram capazes de aderir às células epiteliais alveolares A-549 com baixo grau de associação;
- Os isolados representativos dos genótipos prevalentes não produziram *quorum sensing* com a cepa indicadora utilizada;
- Em conjunto, esses resultados reforçam a necessidade do controle do uso de carbapenemas e a prevenção da disseminação desses organismos, além disso, apontam a necessidade da implementação de medidas de controle de infecção mais eficazes e rigorosas, especialmente nos processos de transferência de pacientes e para profissionais que trabalham em mais de um hospital.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS-HADUCH, J.M. et al. Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 11, p. 3849-54, nov. 2011.
- AKPAKA, P.E. et al. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. **J Clin Microbiol**, v.47, n.8, p. 2670-1, aug. 2009.
- AL-SWEIH, N.A.; AL-HUBAIL, M.A.; ROTIMI, V.O. Emergence of tigecycline and colistin resistance in *Acinetobacter* species isolated from patients in Kuwait hospitals. **J Chemother**, v. 23, n. 1, p. 13-6, feb. 2011.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, oct. 1990.
- AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 289, p. 321-31, 1980.
- ANDRADE, S.S. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram negative bacilli isolate in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2003-2008). **Braz J Infect Dis**, v. 12, Suppl 2, p. 3-9, 2008.
- ANTONIO, C.S. et al. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*<sub>OXA-143</sub> gene in Brazilian hospitals. **Ant Ag Chem**, v. 55, n. 3, p. 1322-3, mar. 2011.
- ANVISA - Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar/Caderno A: Epidemiologia para o Controle de Infecção Hospitalar.
- ARAKAWA, Y. et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 40-43, 2000.
- AYAN, M. et al. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. **J Hosp Infect**, v. 54, p. 39-45, 2003.
- BARCITTA, M. et al. Acquisition and spread of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* in intensive care patients. **Int J Hyg Environ Health**, v. 212, n. 3, p. 330-7, may. 2009.
- BARTUAL, S.G. et al.. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol**, v. 43, p.4382-4390, 2005.
- BASSLER, B.L. Small Talk. **Cell**, v. 109, n. 4, p. 421-424, 2002.

BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R.Y. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). **J Bacteriol**, v. 95, n. 5, p. 1520-41, may. 1968.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter spp* as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, n. 2, p. 148-165, 1996.

BERLAU, J. et al. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 18, p.179–183, 1999.

BERNARDS, A.T. et al. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 25, n. 11, p.1002-4, nov. 2004.

BERTINI, A. et al. Multicopy *bla*<sub>OXA-58</sub> gene as a source of highlevel resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, p. 2324–2328, 2007.

BHARGAVA, N.; SHARMA, P.; CAPALASH, N. Quorum sensing in *Acinetobacter*. an emerging pathogen. **Crit Rev Microbiol**, v. 36, n. 4, p. 349-60, nov. 2010.

BOERLIN, P. et al. Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital. **Vet Microbiol**, v. 82, p. 347–359, 2001.

BOGAERTS, P. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the *bla*OXA-23 gene associated with *ISAbA4* in Belgium. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n.11, p. 4205-6, nov. 2008.

BOGAERTS, P. et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 6, p. 1552-3, jun. 2012.

\_\_\_\_\_ et al. GES extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 11, p. 4872-8, nov. 2010.

BONNIN, R.A. et al. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 1, p. 349-54, jan. 2011a.

\_\_\_\_\_ et al. Genetic diversity of carbapenem-hydrolysing beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Romanian hospitals. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 10, p. 1524-8, out. 2011b.

\_\_\_\_\_ et al. PER-7, an extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward broad-spectrum cephalosporins in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 5, p. 2424-7, may. 2011c.

BOO, T.W.; CROWLEY, B. Detection of *bla*<sub>OXA-58</sub> and *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genes in carbapenem-susceptible *Acinetobacter* clinical isolates: should we be concerned? **J Med Microbiol**, v. 58, p. 839-841, 2009.

BOU, G. et al. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.*, v. 6, n. 12, p. 635-43, dec. 2000a.

\_\_\_\_\_ et al. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 9, p. 3299-305, 2000b.

BOU, G.; MARTÍNEZ-BELTRÁN, J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an *AmpC* beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 2, p. 428-32, 2000.

BOUCHER, Y. et al. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. **Trends Microbiol**, v. 15, p. 301–309, 2007.

BOULANGER, A. et al. NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 4, p. 2214-5, Apr. 2012.

BOUVET, P.J.M., GRIMONT, P.A.D., Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter hemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **Int J Syst Bacteriol**, v. 36, p. 228-240, 1986.

BOUVET, P.J.M.; JEANJEAN, S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. **Res Microbiol**, v. 140, p. 291-299, 1989.

BRADFORD, P.A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Ver**, v. 14, n. 4, p. 933-51, Oct. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde Portaria nº 196 de 24 de julho de 1983. Dispõe sobre as instruções para o controle e prevenção das infecções hospitalares. Brasília, 1983.

BRASIL. Portaria 930 de 27 de agosto de 1992 institui as normas de controle de infecção hospitalar. Ministério da Saúde: Brasil, 1992.

BRASIL. Lei de nº9431 de 06 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do país. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 de Janeiro de 1997. Disponível em <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso em: 15/09/2012.

BRASIL. Portaria nº2616 de 12 de agosto de 1998. Estabelece critérios de classificação entre as diferentes Unidades de Tratamento Intensivo-UTI. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 de agosto de 1998. Disponível em <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 15/09/2012.

BRASIL. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde- Rede RM. Ano III-Edição nº1 de 10 de julho de 2009. Análise de dados: julho de 2006 a junho de 2008. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em 15/09/2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica nº 1/2010, de 25 de outubro de 2010. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microorganismos multirresistentes, 2010. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/serviçodesaude>. Acesso em: 15/09/12.

BRIGANTE, G. et al. Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase *ArmA*. **J Med Microbiol**, v. 61, n. 5, p. 653-61, may. 2012.

BRISOU, J.; PREVOT, A.R. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. **Ann Inst Pasteur**, v. 86, n. 6, p. 722-8, jun. 1954.

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

BUSH, K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, p. 264-70, 1989a.

\_\_\_\_\_ Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, p. 271-6, 1989b.

\_\_\_\_\_ New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin Infect Dis**, v. 32, p. 1085-9, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 969-76, 2010.

BUSH, K, JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 39, p. 1211-33, 1995.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. DNA markers: Protocols, applications and overviews. "Characterization and classification of microbes by Rep-PCR Genomic Fingerprinting and computer-assisted Pattern Analysis". pp. 151- 171. Ed. J. Wiley and Sons, New York, NY, 1997.

CAMBRA, G.; GUEROUT, A.M.; MAZEL, D. Integrons. **Annu Rev Genet**, v. 44, p. 141–166, 2010.

- CARRETTO, E. et al. Widespread carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones in Italian hospitals revealed by a multicenter study. **Infect Genet Evol**, v. 11, n. 6, p. 1319-26, aug. 2011.
- CARVALHAES, C.G. et al. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 2, p. 249-51, feb, 2010.
- CARVALHO, K.R. et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*<sub>OXA-23</sub> collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 34, n. 1, p. 25-8, 2009.
- CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 12, p. 4654-61, dec. 2004.
- CATEL-FERREIRA, M. et al. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 9, p. 2053-6, 2011.
- CAYÔ, R. et al. Analysis of genes encoding penicillin-binding proteins in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 12, p. 5907-13, dec. 2011.
- CELENZA, G. et al. Spread of *bla*<sub>CTX-M-type</sub> and *bla*<sub>PER-2</sub> beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 5, p. 975-8, 2006.
- CHAGAS, T.P. et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **J Appl Microbiol**, v. 111, n. 3, p. 572-81, sep. 2001.
- CHANG, H.C. et al. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 1632 -1639, 2005.
- CHANG, K.C. et al. *Clonal spread of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii* in eastern Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect**, v.45, n. 1, p. 37-42, feb. 2012.
- CHEN, L.Y. et al. Microbial isolation and emergence of antimicrobial resistance associated with tigecycline usage. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 44, n. 5, p. 352-7, oct. 2011.
- CHEN, Y. et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 6, p. 1255-9, jun, 2011.
- CHOI, A. et al. The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-b-1-6-N-acetyl glucosamine PNAG that is critical for biofilm formation. **J Bacteriol**, v. 191, p. 5953–5963, 2009.

CHO, Y.J. et al. Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 64, n. 2, p. 185-90, jun. 2009.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Mol Biol Rev**, v. 65, p. 232–260, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 18<sup>th</sup> ed. Approved standard M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2010.

COELHO, J.M. et al. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. **J Clin Microbiol**, v.44, n. 10, p. 3623-7, oct. 2006.

CORNAGLIA, G.; GIAMARELLOU, H.; ROSSOLINI, G.M. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? **Infect Dis**, v. 11, p. 381–93, 2011.

CORVEC, S. et al. *AmpC* cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. **J Antimicrob Chemother**, v.52, p.629–635, 2003.

\_\_\_\_\_ et al. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*<sub>OXA-23</sub> in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, p. 1530–1533, 2007.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, may. 1999.

COYNE, S.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 3, p. 947-53, mar. 2011.

D'AREZZO, S. et al. Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European clonal types I and II in Rome (Italy). **Clin Microbiol Infect**, v. 15, p. 347–57, 2009.

DA SILVA, G. et al. Identification of widespread, closely related *Acinetobacter baumannii* isolates in Portugal as a subgroup of European clone II. **Clin Microbiol Infect**, v. 13, p. 190–195, 2006.

DALLA-COSTA, L.M. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 7, p. 3403-6, 2003.

DAMIER-PIOLLE, L. S. et al. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 52, p. 557–562, 2008.

DANES, C. et al. Distribution of beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (*AmpC* inhibitor) on the MICs of different beta-lactam antibiotics. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, p. 261-4, 2002.

DE BREIJ, A. et al. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. **Res Microbiol**, v. 160, n. 3, p. 213-8, apr. 2009.

\_\_\_\_\_ et al. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? **PLoS One**, v. 20, n. 5, p. e10732, may 2010.

DIANCOURT, L. et al. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. **PLoS One**, v. 7, p. e10034, 2010.

DIGGLE, S.P.; CRUSZ, S. A.; CAMARA, M. Quorum sensing. **Curr Biol**, v.17, p. R907–R910, 2007.

DIJKSHOORN, L. et al. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. **Syst Appl Microbiol**, v. 21, p. 33-39, 1998.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, p. 939–51, 2007.

DI PAPOLO, A. et al. Molecular epidemiological investigation of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence type scheme. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 2, p.197-201, feb. 2011.

DOI, Y. et al. Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 11, p. 4209-10, nov. 2007.

DONALD, H.M. et al. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 196–9, 2000.

DORTET, L.; et al. Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. **J Clin Microbiol**, v. 44, p.4471-4478, 2006.

DUPONT, M. et al. Identification of na OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. **J Proteome Res**, v. 4, p. 2386-90, 2005.

EGLAND, K.A.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: analysis of the LuxR DNA binding region by alanine-scanning mutagenesis. **J Bacteriol**, v. 183, n. 1, p. 382–6, 2001.

ENDIMIANI, A. et al. Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 6, p. 2211-4, 2007.

ENRIGHT, M.C. et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 1008–1015, 2000.

ESPINAL, P. et al. Dissemination of an NDM-2-producing **Acinetobacter baumannii** clone in an Israeli rehabilitation center. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 11, p. 5396-8, nov. 2011.

EVANS, B.A. et al. Novel genetic context of multiple *bla*<sub>OXA-58</sub> genes in *Acinetobacter* genospecies 3. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, p. 1586–1588, 2010.

\_\_\_\_\_ et al. OXA-51-like b-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, p. 268–75, 2008.

FALAGAS, M.E. et al. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. **Int J Antimicrob Agents**, v. 35, p. 194–9, 2010.

FEIL, E.J. et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **J Bacteriol**, v. 186, p. 1518–30, 2004.

\_\_\_\_\_ et al. Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data. **Genetics**, v. 154, p. 1439–1450, 2000.

FEIZEBALDI, M.M. et al. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of *bla*<sub>OXA</sub> genes among *Acinetobacter* spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. **Jpn J Infect Dis**, v. 61, n. 4, p. 274-8, jul. 2008.

FERNÁNDEZ-CUENCA, F. et al. Relationship between b-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 51, p. 565–74, 2003.

FERREIRA, A.E. et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. from hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 6, p. 725-30, nov-dec. 2011.

FIGUEIREDO, D.Q. et al. First report of the *bla*<sub>(OXA-58)</sub> gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 368-70, may. 2011.

FIGUEIREDO S, et al. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to ISAba1-mediated overexpression of the natural

blaOXA-66 oxacillinase gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, p. 2657- 9, 2009a.

\_\_\_\_\_ et al. Overexpression of the naturally occurring *bla*<sub>OXA-51</sub> gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence IS<sub>Aba9</sub>. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 4045-7, 2009b.

FIORILLI, G. et al. Emergence of metallo-beta-lactamases in *Acinetobacter spp* clinical isolates from Argentina. **Rev Esp Quimioter**, v. 23, n. 2, p.100-2, jun. 2010.

FONSECA, E.L. et al. Class 2 integrons in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in different Brazilian geographic regions. **Int J Antimicrob Agents**, v. 38, n. 1, p. 95-6, jul. 2011.

FONTANA, C. et al. *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates. **BMC Infect Dis**, v. 8, p. 79, jun. 2008.

FOURNIER, P.E.; RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 5, p. 692-9, 2006.

FU, Y. et al. Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 22 in multiple cities of China. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, p. 644–50, 2010.

FUQUA, C.S.; Winans, S.C. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. **J Bacteriol**, v. 176, n. 10, p. 2796-806, may. 1994.

FURTADO, G.H. et al. Bloodstream infections with OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in a university-affiliated hospital in Brazil: epidemiology and clinical outcomes. **Am J Infect Control**, v. 39, n. 8, p. 706-8, oct. 2011.

GADDY, J.; ACTIS, L. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiol**, v. 4, p. 273–278, 2009.

GADDY, J.A.; TOMARAS, P.A.; ACTIS, L.A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Interaction of this Pathogen with Eukaryotic Cells. **Infect Immun**, v. 77, n. 8, p. 3150–3160, 2009.

GALES, A.C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, n. 4, p. 354-60, aug. 2012.

\_\_\_\_\_ et al. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 45, n. 1, p. 77-9, jan. 2003.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). **Clin Microbiol Infect**, v. 12, p. 315–21, 2006.

GARRITY, M. et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 2, The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria, 2 ed. Springer, 2005.

GAYNES R, EDWARDS JR. National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 6, p. 848-54, sep. 2005.

GERNER-SMIDT, P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **J Clin Microbiol**, v. 30, p. 2680 e 2685, 1992.

GHAZAWI, A. et al. NDM-2 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in the United Arab Emirates. v. 18, n. 2, p. E34-6, feb. 2012.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELLAKOPOULOU, K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, n. 2, p. 106-19, aug. 2008.

GIANNOULI, M. et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, p. 828–830, apr. 2009.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. First isolation of the *bla*<sub>OXA-23</sub> carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 1, p. 578-9, jan. 2010.

GNIADKOWSKI, M. Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, Suppl 1, p. 11-32, Jan. 2008.

GOGOU, V. et al. Evolution of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 12, p. 2767-72, dec. 2011.

GONZALEZ, R.H. et al. Quorum sensing signal profile of *Acinetobacter* and environmental sources. **Rev argent microbial**, v. 41, n. 2, p. 73-8, 2009.

GONZALEZ, R.H.; NUSBLAT, A.; NUDEL, B.C. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. **Microbiol Res**, v. 155, p. 271–277, 2001.

GÖTTIG, S. et al. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. **Lancet Infect. Dis**, v. 10, p. 828–829, 2010.

GRASER, Y. et al. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. **J Clin Microbiol**, v. 31, p. 2417–2420, 1993.

GRIBUN, A. et al. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol*, v. 47, p. 434-43, 2003.

GRUNDMANN, H. et al. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. **J clin Microbiol**, v. 33, n. 3, p. 528-534, 1995.

\_\_\_\_\_ et al. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter spp.* **J Clin Microbiol**, v. 35, n.12, p. 3071-7, dec. 1997.

GUNDI, V.A. et al. Validation of partial rpoB gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. **Microbiology**, v. 155, p. 2333- 2341, 2009.

HALL, R.M.; COLLIS, C.M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site- specific recombination. **Mol Microbiol**, v. 15, p. 593–600, 1995.

HAMMAMI, S. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in Tunisia. **Tunis Med**, v. 89, n. 7, p. 638-43, jul. 2011.

HERITIER, C. et al. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49, p. 4174- 9, 2005.

HÉRITIER, C. POIREL, L. NORDMANN, P. Cephalosporinase overexpression resulting from insertion of IS*Aba1* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*, v. 12, p. 123–130, 2006.

HIGGINS, P.G. et al. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Ant Chem**, v. 65, p. 233-8, 2010.

\_\_\_\_\_ et al. OXA-143, a novel carbapenemhydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 53, 5035–8, 2009.

\_\_\_\_\_ et al. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 54, p. 821–3, 2004.

HOCHHUT, B. et al. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholera* O139 and O1 SXTconstins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 2991–3000, 2001.

HOLLOWAY, K.P. et al. Polymyxin B and doxycycline use in patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in the intensive care unit. **Ann Pharmacother**, v. 40, p. 1939–45, 2006.

HOUANG, E.T. et al. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. **J Clin Microbio**, v. 39:228–234, 2001.

HRABÁK, J. et al. NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient repatriated to the Czech Republic from Egypt, July 2011. *Euro Surveill*, v. 17, n. 7, p. 20085, feb. 2012.

HUANG, L.Y. et al. Molecular characterization of beta-lactamase genes and their genetic structures in *Acinetobacter* genospecies 3 isolates in Taiwan. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 6, p. 2699-703, 2010.

\_\_\_\_\_ et al. Dissemination of multidrug-resistant, class 1 integron-carrying *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, n. 11, p. 1010-9, 2008.

HUANG, Z.M. et al. 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, n. 5. 425–427, 2004.

HUJER, K.M. et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter sp.* isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50, p. 4114–23, 2006.

\_\_\_\_\_ et al. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 7, p. 2941-8, 2005.

HUYS, G. et al. Biodiversity of chloramphenicol resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. **Res Microbiol**, v. 158, p. 228–235, 2007.

IMPERI F, et al. (2011) The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. **IUBMB Life**, v. 63, n. 12, p. 1068-74, dec. 2011.

IRIE, Y.; PARSEK, M.R. Quorum sensing and microbial biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 322, p. 67–84, 2008.

ISLAM, M.A. et al. Emergence of multidrug-resistant NDM-1-producing Gram-negative bacteria in Bangladesh. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 10, p. 2593-600, oct. 2012.

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

JACOBY, G.A.; MUNOZ-PRICE, L.S. The new beta-lactamases. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 380-91, 2005.

JAWAD, A. et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. **J Clin Microbiol**, v. 36, p. 1938–1941, 1998.

JEON, B.C. et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 2241–5, 2005.

JEONG, S.H. et al. Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. **J Microbiol**, v. 44, p. 423-31, 2006.

JIANG, W. et al. Study on the Resistant Genes to Carbapenems and Epidemiological Characterization of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. **Microb Drug Resist**, jul. 2012. [Epub ahead of print].

JOLY-GUILLOU, M.L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, p. 868–873, 2005.

JYOTHISRI, K.; DEEPAK, V.; RAJESWARI, M.R. Purification and characterization of a major 40 kda outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. **FEBS Lett**, v. 443, p. 57-60, 1999.

KAASE, M. et al. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 6, p. 1260-2, jun. 2011.

KALLEL, H. et al. Safety and efficacy of colistin compared with imipenem in the treatment of ventilator-associated pneumonia: a matched case-control study. **Intensive Care Med**, v. 33, p. 1162–7, 2007.

KARAGEORGOPOULOS, D.E. et al. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, p. 45–55, 2008.

KARAH, N. et al. Emergence of OXA-carbapenemase and 16S rRNA methylase-producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. **J Med Microbiol**, v. 60, n. 4, 515-21, apr. 2011.

KARTHIKEYAN, K.; THIRUNARAYAN, M.A.; KRISHNAN, P. Coexistence of *bla*<sub>OXA-23</sub> with *bla*<sub>NDM-1</sub> and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 10, p. 2253-4, oct. 2010.

KIMURA, S. Clonal diversity of metallo-beta-lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 458-61, 2005.

KO KS, et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, p. 1163–7, 2007.

KOELEMAN, J.G. Antibiotic resistance is a major risk factor for epidemic behavior of *Acinetobacter baumannii*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 22, n. 5, p. 284-8, 2001.

KOH, T.H. et al. IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n. 4, p. 627-32, apr. 2007.

KOHLBERG, A. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. **J Med Microbiol**, v. 58, p. 1499–507, 2009.

KRAWCZYK, B. et al. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. **Mol Cell Probes**, v. 16, p. 1-11, 2002.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 130, aug. 2006.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H.P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 57, n. 10, p. 1486-513, jul. 2005.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1671–1673, 2004.

LAMBIASE, A. et al. *Persistence of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii* strains in an Italian intensive care unit during a forty-six month study period. **New Microbiol**, v. 35, n. 2, p. 199-206, apr. 2012.

LANDMANN, D. et al. Genetic relatedness of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. **Epidemiol Infect**, v. 137, n. 2, p. 174-80, feb. 2009.

LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of *bla<sub>VIM</sub>*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 7, p. 1584-90, jul, 1999.

LEE, H. et al. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 56, n. 3, p. 305-12, nov. 2006.

LEE, H.W. et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clin Microbiol Infect**, v.14, n. 1, p. 49–54, jan. 2008.

LEE, J.C. et al. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. **Res Microbiol**, v. 157, p. 360-366, 2006.

LEE, K. et al. Evaluation of the Hodge test and the imipenem–EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 4623–9, 2003.

\_\_\_\_\_ et al. Evaluation of Etest MBL for detection of *bla*<sub>IMP-1</sub> and *bla*<sub>VIM-2</sub> allelic-positive clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 942–944, 2005b.

\_\_\_\_\_ et al. Modified Hodge and EDTA - disk synergy tests to screen metallo-β-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clin Microbiol Infect**, v. 7, p. 88-91, 2001.

\_\_\_\_\_ et al. Multidrug resistant *Acinetobacter spp.*: nosocomial pathogens increasingly problematic nosocomial pathogens. **Yonsei Med J**, v. 52, n. 6, p. 879-91, nov. 2011.

\_\_\_\_\_ et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*<sub>(SIM-1)</sub>, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 11, p. 4485-91, nov. 2005a.

LEE, M.H. et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*<sub>(OXA-23)</sub> from hospitals in central Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect**, sep. 2012. [Epub ahead of print]

LEE, Y. et al. A novel insertion sequence, *ISAba10*, inserted into *ISAba1* adjacent to the *bla*<sub>(OXA-23)</sub> gene and disrupting the outer membrane protein gene *carO* in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 361-3, 2011.

\_\_\_\_\_ et al. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the *bla*<sub>OXA-66</sub> gene. **Ann Clin Lab Sci**, v. 40, n. 1, p. 43-8, win. 2010.

LEE, Y.T. et al. Emergence of carbapenem-resistant non-*baumannii* species of *Acinetobacter* harboring a *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene that is intrinsic to *A. baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 2, p. 1124-7, feb. 2012.

\_\_\_\_\_ et al. First identification of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> in non-*baumannii Acinetobacter spp.* **J Chemother**, v. 21, n. 5, p. 514-20, nov. 2009.

LÉVESQUE, C. et al. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 39, p. 185-191, 1995.

LEVIN, A.S. et al. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Sao Paulo, Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 17, n. 6, p. 366-8, 1996

\_\_\_\_\_ et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis**, v. ;28, p. 1008–11, 1999.

LIAKOPOULOS, A. et al. Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. **Euro Surveill**, v. 17, n. 11, p. 20117, mar. 2012.

LIMA, A.L.; OLIVEIRA, P.R.; PAULA, A.P. *Acinetobacter* infection. **N Engl J Med**, v. 358, n. 26, p. 2846, jun. 2008.

LINCOPAN, N. et al. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 1, p. 516-9, jan. 2005.

\_\_\_\_\_ et al. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. **J Med Microbiol**, v. 55, n. 11, p.1611-3, nov. 2006.

LIVERMORE, D.M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, p. 557-84, 1995.

\_\_\_\_\_ Defining na extended-spectrum beta-lactamase. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, Suppl 1, p. 3-10, jan. 2008.

\_\_\_\_\_ Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **J Antimicrob Chemother**, v. 47, p. 247-250, 2001.

LIVERMORE, DM.; WOODFORD, N. Carbapenemases: a problem in waiting? **Curr Opin Microbiol**, v. 3, n. 5, p. 489-95, oct. 2000.

\_\_\_\_\_ The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v.14, p.413-420, 2006.

LOEHFELM, T.; LUKE, N.; CAMPAGNARI, A. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. **J Bacteriol**, v. 190, p.1036–1044, 2008.

LU, P.L. et al. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 4, p. 641-7, apr. 2009.

LUO, L. et al. Efflux pump overexpression in conjunction with alternation of outer membrane protein may induce *Acinetobacter baumannii* resistant to imipenem. **Chemotherapy**, v. 57, p. 77-84, 2011.

MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 45, p. 3375–80, 2001.

MAIDEN, M.C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 3140–3145, 1998.

MAMMINA, C. et al. Characterization of *Acinetobacter baumannii* from intensive care units and home care patients in Palermo, Italy. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 11, p. E12-5, nov. 2011.

\_\_\_\_\_ et al. Epidemiology and clonality of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from an intensive care unit in Palermo, Italy. **BMC Res Notes**, v. 20; n. 5, p. 365, jul. 2012.

MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 8<sup>th</sup> edition. Patric R. Murray; Ellen Jo Baron, James H Jorgensen; Michael A. Pfaller, Robert H. Tenover 2007.

MARAGAKIS, L.L.; PERL, T.M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*, v. 46, n. 8, p. 1254-63, apr. 2008.

MARQUÉ. S. et al. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 4885–8, 2005.

MARTINS, A.F. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. **Infection**, v. 37, n. 5, p. 474-6, 2009.

\_\_\_\_\_ et al. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. **Infection**, v. 35, n. 6, p. 457-60, dec. 2007.

\_\_\_\_\_ et al. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil, **Am J Infect Control**, v. 40, n. 2, p. 108-12, mar. 2011.

MATASEJE L.F. et al. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program*. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 6, p. 1359-67, jun. 2012.

MATTOS K.A. et al. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. **Cell Microbiol**, v. 13, p. 259-73, feb. 2011.

MAZEL, D. et al. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. **Science**, v. 280, p. 605-608, 1998.

MENDES, R.E. et al. Codetection of *bla*<sub>OXA-23</sub> gene (*bla*<sub>OXA-133</sub>) and *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter radioresistens*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents Chemothe**, v. 53, p. 843-844, 2009.

\_\_\_\_\_ et al. Characterization of an integron carrying *bla*<sub>IMP-1</sub> and a new aminoglycoside resistance gene, *aac*(6')-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, p. 2611–2614., 2007.

MICHALOPOULOS, A.; Falagas, M.E. Colistin and polymyxin B in critical care. **Crit Care Clin**, v. 24, n. 2, p. 377-91, apr. 2008.

MICHALOPOULOS, A.S. et al. Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria: the renaissance of an old antibiotic. **Clin Microbiol Infect**, v. 11p. 115–21, 2005.

MINANDRI, F. et al. Evidence of diversity among epidemiologically related carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to international clonal lineage II. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 3, p. 590-7, mar. 2012.

MILLER, J. 1972. Experiments in Molecular Genetics, p. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 1972.

MOSKOWITZ, S.M. et al. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 1915-22, 2004.

MOUBARECK, C. et al. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 53, n. 8, p. 3579–81, 2009.

MUGNIER, P.D et al. Worldwide dissemination of the *bla*<sub>OXA-23</sub> carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 1, p. 35-40, jan. 2010.

MUGNIER, P.D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Functional analysis of insertion sequence IS*Aba1*, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. **J Bacteriol**, v. 191, p. 2414–2418, 2009.

MUNOZ-PRICE, L.S.; WEINSTEIN, R.A. *Acinetobacter* infection. **N Engl J Med**, v. 358, n. 12, p. 1271-82, mar. 2008.

MUSSI, M.A.; LIMANSKY, A.S.; VIALE, A.M. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of  $\beta$ -barrel outer membrane proteins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 1432–40, 2005.

MUSSI, M. A.; RELING, V.M; LIMANSKY, A.S. CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L-ornithine uptake. **FEBS Lett**, v. 581, p. 5573-8, 2007.

NAAS T. et al. Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 5, p. 1174-6, 2007.

\_\_\_\_\_ et al. VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii*, France. **Emerg Infect Dis**, v. 12, p. 1214- 22, 2006.

NAGANO, N. et al. Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2 type betalactamase. *J Clin Microbiol*, v. 41, n. 12, p. 5530-6, 2003.

\_\_\_\_\_ et al. Nosocomial transmission of CTX-M-2 b-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol*, v. 42, n. 9, p. 3978–84, 2004.

NAIEMI, N.A. et al. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 9, p. 4862-4, 2005.

National Center for Infectious Diseases, CDC, Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Foodborne and Diarrheal Diseases Branch. Subtipificación de patógenos bacterianos de transmisión alimentaria. Manual de Procedimientos Laboratorio – Traducción del “Standardized Molecular Subtyping of Foodborne Bacterial Pathogens by Pulsed-Field Gel Electrophoresis”. Buenos Aires, 2004.

NAVON-VENEZIA, S.; LEAVITT, A.; CARMELI, Y. High tigecycline resistance in multidrugresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, v. 4, p. 772–4, 2007.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 60, p. 896-903, 2010.

\_\_\_\_\_ et al. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 53, p. 1563-1567, 2003.

\_\_\_\_\_ et al. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol*, v. 53, n. 12, p. 1233-40, dec, 2004.

\_\_\_\_\_ et al. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J Antimicrob Chemother*, v. 62, n. 3, p. 484-9, sep. 2008.

\_\_\_\_\_ et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol*, v. 162, n. 4, p. 393-404, may. 2011.

NEMEC, A. KRIZOVA, L. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the NDM-1 gene, Czech Republic, 2011. *Euro Surveill*, v. 17, n. 11, p. pii: 20121, mar. 2012.

NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L.; VAN DER REIJDEN, T. J. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter*

- baumannii* strains in the Czech Republic. *J Med Microbiol*, v. 53, p. 147–153, 2004.
- NICASIO AM, KUTI JL, NICOLAU DP. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. **Pharmacotherapy**, v. 28, p.235-49, 2008.
- NISHIMURA, Y.; INO, T.; IIZUKA, H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. **Int J of Syst Bacteriol**, v. 38, p, 209-211, 1988.
- NIU, C. et al. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. **J Bacteriol**, v. 190, p. 3386–3392, 2008.
- NIUMSUP, P.R. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 62, n. 152-4, 2009.
- NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, n. 6, p. 321-31, 2002.
- NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, v. 9, p. 228-36, 2009.
- NUNES-DÜBY, S.E. et al. Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. **Nucleic Acids Res**, v. 26, p. 391–406, 1998.
- PAGEL, J.E.; SEYFRIED, P.L. Numerical taxonomy of aquatic *Acinetobacter* isolates. **J Gen Microbiol**, v. 95, p. 220-32, 1976.
- PARK, Y.K. et al. Independent emergence of colistin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from Korea. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 64, n. 1, p. 43-51, may. 2009a.
- \_\_\_\_\_ et al. Two distinct clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Korean hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 64, n. 4, p. 389-95, aug. 2009b.
- PASTERÁN, F. et al. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 9, p. 3222-4, 2006.
- PATON R, et al. ARI-1: b-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 2, n. 2, p. 81–7, 1993.
- PELEG, A.Y. et al. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, p. 128–31, 2007.
- PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, n. 3, p. 538-82, 2008.
- PEREZ, F. et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 10, p. 3471-84, oct, 2007.

PETERS, E.D.J. et al. Novel gene cassettes and integrons. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 2961-2964, 2001.

PEYMANI, A. et al. Characterisation and clonal dissemination of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, northwest Iran. *Int J Antimicrob Agents*, v. 39, n. 6, p. 526-8, jun. 2012.

PFEIFER, Y. et al. Molecular characterization of *bla*<sub>NDM-1</sub> in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 9, p. 1998-2001, sep. 2011.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G.A. Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 1-11, 2002.

PLOY, M.C. et al. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. **Clin Chem Lab Med**, v. 38, p. 483-487, 2000.

POIREL, L. et al. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 1252–1256, 2008.

\_\_\_\_\_ et al. P.Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 6, p. 2420-4, jun. 2010.

\_\_\_\_\_ et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid-and-integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in France. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 44, n. 4, p. 891-7, 2000.

\_\_\_\_\_ et al. Identification of the novel narrow-spectrum beta-lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 6, p. 2179-84, jun. 2007.

\_\_\_\_\_ et al. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. **J.Clin. Microbiol**, v. 41, p. 3542–7, 2003.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D. beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 1, p. 24-38, 2010.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Genetic structure at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 1442–1448, 2006.

POOLE, K. Eflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Ann Med**, v. 39, n. 3, p. 162-76, 2007.

\_\_\_\_\_. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 3, p. 77–98, 2002.

POTERA, C. Forging a link between biofilms and disease. **Science**, v. 283, n. 5409, p. 1837-1839, mar. 1999.

POTRON et al. Genetic features of CTX-M-15-producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 12, p. 5946-8, dec. 2011.

QUEENAN, AM.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 3, p. 440-58, 2007.

RAMÍREZ, M.S.; PIÑEIRO, S.; CENTRÓN, D. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, p.699–706, 2010.

RAMÍREZ, M.S. et al. Class 2 integrons dissemination among multidrug resistance (MDR) clones of *Acinetobacter baumannii*. **Curr Microbiol**, v. 64, n. 3, p. 290-3, mar. 2012.

RAO, R.S. et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Indian J Med Microbiol**, v. 26, n. 4, p. 333-7, oct-dec. 2008.

RASKO, D.A.; SPERANGIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 2, p. 117-28, feb. 2010.

RASKO, D.A. et al. , 2008; Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. **Science**, v. 321, n. 5892, p. 1078-80, aug. 2008.

RAVASI, P. et al. IS*Aba825*, a functional insertion sequence modulating genomic plasticity and *bla*<sub>OXA-58</sub> expression in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 917–920, 2011.

RECCHIA, G.D.; HALL, R.M. Gene cassettes: a new class of mobile element. **Microbiol**, v. 141, p. 3015-3027, 1995.

REMENTERIA, A. et al. Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. **Clin Microbiol Infect**, v. v. 7, n. 6, p. 331-6, jun. 2001.

RICCIO, M.L. et al. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 5, p. 1229-35, may. 2000.

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

ROBLEDO, I.E.; AQUINO, E.E.; VÁZQUEZ, G.J. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 6), p. 2968-70, jun. 2011.

RODRIGUEZ-BANO, J. ET AL. BIOFILM FORMATION IN *ACINETOBACTER BAUMANNII*: ASSOCIATED FEATURES AND CLINICAL IMPLICATIONS. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, n. 3, p. 276-8, mar. 2008.

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

ROSSOLINI, G.M.; D'ANDREA, M.M.; MUGNAIOLI, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, Suppl 1, p. 33-41, jan. 2008.

RUIZ, M. et al. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. **Clin Microbiol Infect**,; v. 13, n. 1192–1198, 2007.

RUNNEGAR, N. et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 10-year period. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 11, p. 4051-6, nov. 2010.

RUZIN, A.; KEENEY, D.; BRADFORD, P. A. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, p. 1001–1004, 2007.

SACHA, P. et al. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*--a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 46, n. 2, p. 137-42, 2008.

SADER, H.S. et al. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases en Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int J Antimicrob Agents**, v. 1, p. 57-61, 2005.

\_\_\_\_\_ et al. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 13-8, jul. 1993.

\_\_\_\_\_ et al. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Braz J Infect Dis**, v. 8, p. 25-79, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.

SCHIMITH-BIER, K.E. et al. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. **Am J Infect Control**, v. 38, n. 4, p. 308-14, may. 2010.

SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 67-75, 1984.

SECHI, L.A. et al. PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. **Med Sci Monit**, v. 10, n. 6, p. 180-4, jun. 2004.

SEIFERT, H. et al. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. **J Clin Microbiol**, v. 35, p. 2819–2825, 1997.

\_\_\_\_\_ et al. Plasmid DNA fingerprinting of *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol**, v. 32, p. 82–86, 1994a.

\_\_\_\_\_ et al. Plasmid DNA profiles of *Acinetobacter baumannii*: clinical application in a complex endemic setting. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 15, p. 520–528, 1994b.

\_\_\_\_\_ et al. The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. **Zentralbl Bakteriol**, v. 279, n. 4, p. 544–552, nov. 1993.

SEIFERT, H.; GERNER-SMIDT, P. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. **J. Clin. Microbiol**, v. 33, p. 1402–1407, 1995.

SEKIGUCHI, J. et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 11, p. 4194-7, nov. 2008.

SENDA, K. et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 2909-2913, 1996.

SHAHCHERAGHI, F. et al. Isolation and genetic characterization of metallo-beta-lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. **Iran J Microbiol**, v. 3, n. 2, p. 68-74, jun. 2011.

SHAKIL, S.; KHAN, A.U. Detection of CTX-M-15-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from urine from an Indian hospital. **J Chemother**, v. 22, n. 5, p. 324-7, oct. 2010.

SILBERT, S. et al. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative gramnegative bacilli. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 25, p. 847–851, 2004.

SILVA, LUCIENE RIBEIRO DA COSTA, Perfil de resistência e disseminação clonal de cepas de *Acinetobacter* spp. em hospitais da cidade do Rio de Janeiro. 2010. 84f.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica Humana)-Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev*, v. 19, n. 3, p. 512-30, jul. 2006.

SIO, C.F. et al., 2006). Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Infect Immun**, v. 74, n. 3, p. 1673-82, mar. 2006.

SIROY, A. et al. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 12, p. 4876-83, dec. 2005.

SLAMA, T.G. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care*, v. 12, n. 4, p. S4, 2008.

SMILLIE, C. et al. Mobility of plasmids. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 3, p. 434-452, sep, 2010;

SNELLING, A.M. et al. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 1193-202, may. 1996.

SOULI, M. et al. In vitro activity of tigecycline against multiple-drugresistant, including pan-resistant, Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from Greek hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3166–9, 2006.

STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Mol Microbiol**, v. 52, n. 4, p. 917-24, may. 2004.

STEPANOVI, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J microbiol Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

STOEVA, T. et al. Nosocomial spread of OXA-23 and OXA-58 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian hospital. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, p. 618-20, 2009.

STOKES, H.W.; HALL, R.M. A novel family of potential mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Mol Microbiol**, v. 3, p. 1669-1683, 1989.

STRATEVA, T. et al. Emergence of 16s rRNA methylase-producing nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in Bulgaria. **J Chemother**, v. 23, n. 6, p. 374-5, dec, 2011.

SUNG, J.Y. et al. AbaR7, a genomic resistance island found in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Daejeon, Korea. **Ann Lab Med**, v. 32, n. 5, p. 324-30, sep. 2012.

TANEJA, N. et al. Emergence of tigecycline & colistin resistant *Acinetobacter baumannii* in patients with complicated urinary tract infections in north India. **Indian J Med Res**, v. 133, p. 681-4, jun. 2011.

TENOVER, F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2233-9, sep. 1995.

TIAN, G.B. et al. Extended-spectrum AmpC cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 confers resistance to cefepime. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 10, p. 4922-5, oct. 2011.

TJERNBERG, I.; URSING, J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. **APMIS**, v. 97, p. 595-605, 1989.

TOGNIM, M.C. et al. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 27, n. 7, p. 742-7, jul. 2006.

TOLEMAN, M.A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, n. 5, p. 673-9, nov. 2002.

TOMARAS, A.P. et al. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**, v. 149, p. 3473–3484, 2003.

TOMAS DEL MAR, M. et al. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 5172-5, 2005.

TOWNER, K.J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. **J Hosp Infect**, v. 73, n. 4, p. 355-63, dec. 2009.

\_\_\_\_\_ Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. **J Med. Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 721-746, 1997.

TOWNER, K.J. et al. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, n. 2, p. 161-7, feb, 2008.

TOWNER, K.J.; LEVI, K.; VLASSIADI, M. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, p. 161–7, 2007.

TURTON, J.F. et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> carbapenemase gene intrinsic to this species. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 2974-6, aug. 2006a.

\_\_\_\_\_ et al. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 258, p. 72–77, 2006b.

\_\_\_\_\_ et al. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect**, v. 13, p. 807–15, 2007.

UNAL, S.; GARCIA-RODRIGUEZ, J. A. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Isolated in the MYSTIC Program, 2002–2004. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 53, p. 265–271, 2005.

UROZ, S.; DESSAUX, Y.; OGER, P. Quorum Sensing and Quorum Quenching: The Yin and Yang of Bacterial Communication. **ChemBioChem**, v.10, p.205–216, 2009.

VAHABOGLU, H. et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 2265-9, p. 1997.

VALENTINE, S.C. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2499-507, 2008.

VALENZUELA, J.K. et al. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 453-60, 2007.

VAN DEN BROEK, P.J. et al. Endemic and epidemic *Acinetobacter* species in a university hospital: an 8-year survey. **J Clin Microbiol**, v.47, p. 3593-3599, 2009.

\_\_\_\_\_ et al. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001, **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 9, p. 837-43, sep. 2006.

VAN DESSEL, H. et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. **Res Microbiol**, v. 155, p.105–12, 2004.

VANDAMME, P. et al. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. e a new twist to an old story. **Res Microbiol**, v. 154, p. 91-96, 2003.

VANEECHOUTTE, M. et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 11–5, 1995.

VIANA G.F. et al, Evolution of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital. **Lett Appl Microbio**, v. 53, n. 3, p. 374-8, 2011.

VILA, J.; MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, v. 9, n. 6, p. 1210-5, 2007.

VILLALÓN P, et al. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J Clin Microbiol*, v. 49, n. 3, p. 875-82, mar. 2011.

VILLEGAS, M.V. et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 2001-4, 2007.

VILLEGAS, MV; HARTSTEIN, AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24:284-95.

WALSH, T.R. et al. Evaluation of a new Etest for detecting metallo--lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol*, v. 40, p. 2755–2759, 2002.

\_\_\_\_\_ et al. Metallo-betalactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*, v. 18, p. 306–325, 2005.

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

WATANABE, M. et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 35, n. 1, p. 147-51, 1991.

WATER, C.M.; BASSLER, B.L. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v.21, p. 319–346, 2005.

WERNECK, J.S. et al. Low prevalence of *bla*<sub>OXA-143</sub> in private hospitals in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 55, n. 9, p. 4494-5, sep, 2011a.

\_\_\_\_\_ et al. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother*, v. 66, n. 2, p. 452-4, feb. 2011b.

WHITEHEAD, N.A. et al. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Rev**, v. 25, n. 4, p. 365–404, 2001.

WHITMAN, T.J. et al. Occupational transmission of *Acinetobacter baumannii* from a United States serviceman wounded in Iraq to a health care worker. *Clin Infect Dis*, v. 47, p. 439–43, 2008.

WINOKUR, P.L. et al. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis*, v. 32, Suppl 2, p. S94-103, may. 2001.

WOLTER, D.J. et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-

18 beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 4, p. 1660-4, apr. 2009.

WOODFORD, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* **Int J Antimicrob Agents**, v. 27, n. 4, p. 351-3, apr. 2006.

YAMAMOTO, S.; BOUVET, P.J.; HARAYAMA, S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. **Int J Syst Bacteriol**, v. 49, p. 87-95, 1999.

YONG, D. et al. A novel sub-group metallo- $\beta$ -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* from Austrália. In 47<sup>th</sup> ICAAC. Vol abstract C1-593. Chicago. USA: 47<sup>th</sup> ICAAC p.75, 2007.

\_\_\_\_\_ et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 12, p. 5046-54, dec. 2009.

\_\_\_\_\_ et al. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter spp.* in Korea. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 1749-51, 2003.

YOUNG, L.S.; SABEL, A.L.; PRICE, C.S. Epidemiologic, clinical, and economic evaluation of an outbreak of clonal multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a surgical intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 28, p. 1247-54, 2007.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C.; VERNET, T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. **FEMS Microbiol Ver**, v. 32, p. 361–385, 2008.

ZARRILLI, R. et al. Clonal spread and patient risk factors for acquisition of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit in Italy. **J Hosp Infect**, v. 82, n. 4, p. 260-5, dec. 2012.

ZAVASCKI, A.P. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, n. 1, p. 71-93, jan. 2010.

\_\_\_\_\_ et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 6, p. 1206-15, dec. 2007.

ZHAO, W.H. et al. Relevance of resistance levels to carbapenems and integron-borne *bla*IMP-1, *bla*IMP-7, *bla*IMP-10 and *bla*VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol**, v. 58, p. 1080–1085, 2009.

ZHOU, H. et al. Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the IS*Aba1* *bla*<sub>OXA-23</sub> genes in a Chinese hospital. **J Med Microb**, v. 56, p. 1076-80, 2007.

ZHOU, Y. et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 29, n. 11, p. 1349-53, nov. 2010.

## APÊNDICE A



XIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICOBACTÉRIAS  
III SIMPÓSIO DE COLEÇÕES DE CULTURAS  
II SIMPÓSIO DE ESCHERICHIA COLI "LUIZ RACHID TRABULSI"

# Certificado

Certificamos que o trabalho "PREVALÊNCIA DE BLAOXA-23 E ISABA1 EM ACINETOBACTER BAUMANNII RESISTENTES OU SENSÍVEIS AO IMIPENEM NO RIO DE JANEIRO." com a autoria de: CARVALHO KR, PASSOS FLD, SANTOS LCG, PEREIRA MJF, CARVALHO-ASSEF APD'A, ASENSI MD foi apresentado na forma de pôster durante o "25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA" em 10 de Novembro de 2009, em Porto de Galinhas-PE.

Porto de Galinhas, 12 de novembro de 2009.



Marina Baquerizo Martinez  
Presidente da SBM



Carlos Pelleschi Taborda  
1º Secretário da SBM

## APÊNDICE B

Certificado de apresentação do trabalho sob forma de poster e: Ocorrência de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenemas pela produção de beta-lactamases OXA-23 em diversos estados do Brasil. Apresentado na forma de poster e discussão temática, durante o V Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária (SIMBRAVISA), no período de 13 a 17 de novembro de 2010 em Belém-Pará.

STATUS	TÍTULO	COMPROVANTE	DT	DATA E LOCAL DE APRESENTAÇÃO
APROVADO	OCORRÊNCIA DE ACINETOBACTER BAUMANNII RESISTENTE A CARBAPENEMAS PELA PRODUÇÃO DE BETA-LACTAMASES OXA-23 EM DIVERSOS ESTADOS DO BRASIL.	[imprimir]	DT21 Rio Maicuru	17/11/2010 15:00 - 17:00 Sala 8

Tema: 10. Estudos e investigações de interesse da vigilância sanitária

Texto (resumo): O Programa de Controle de Infecção em Serviços de Saúde tem como meta principal controlar a disseminação da resistência microbiana em serviços de saúde no país, por meio do conhecimento do perfil de resistência microbiana e adoção de medidas de prevenção e controle. O aumento da taxa de resistência antimicrobiana entre patógenos hospitalares é particularmente preocupante, pois aumenta a morbidade, mortalidade e o custo associado às infecções hospitalares. O *Acinetobacter baumannii* é um patógeno oportunista com crescente importância em infecções hospitalares. Os carbapenemas, imipenem e meropenem estão entre as drogas de escolha utilizadas no tratamento dessas infecções. Entretanto, a resistência a esses compostos, através da aquisição de genes de resistência, vem crescendo rapidamente e surtos de *A. baumannii* resistente a carbapenemas tem sido observados em todo mundo, inclusive no Brasil. Em virtude da disseminação e persistência deste patógeno no ambiente hospitalar este estudo buscou caracterizar a produção da enzima OXA-23, responsável pela resistência às carbapenemases, em 130 isolados de *A. baumannii* provenientes de espécimes clínicos encaminhados pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública dos estados do Espírito Santo (n=22), Goiás (n=58), Minas Gerais (4) e Rio de Janeiro (46), coletados de diferentes pacientes no período de outubro de 2008 a abril de 2010. A confirmação da identificação da espécie *A. baumannii* foi realizada através de PCR para o gene blaOXA-51, intrínseco desta espécie. A suscetibilidade ao imipenem foi avaliada utilizando-se o teste de difusão em ágar. Foram realizados PCR e sequenciamento do DNA para detecção do gene blaOXA-23. A maioria dos isolados de *A. baumannii* foram resistentes ao imipenem (95,38%, n=124), sendo 98,38% (n=122) positivos para o gene blaOXA-23. Estes isolados estavam disseminados entre todos os hospitais estudados, sendo um do Espírito Santo, quatro de Goiás, um de Minas Gerais e dez do Rio de Janeiro. Esta enzima não foi detectada nos isolados sensíveis ao imipenem (n=6). Estes dados são alarmantes, principalmente devido à rápida aquisição de resistência e disseminação deste patógeno no ambiente hospitalar. Assim, estudos epidemiológicos moleculares e o conhecimento do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos são fundamentais para a detecção e compreensão dos padrões de ocorrência destes mecanismos de resistência em nosso meio a fim de implementar diretrizes preventivas de sua disseminação.

Nome do Apresentador: Karyne Rangel Carvalho

Dados dos Autores: > Karyne Rangel Carvalho - Carvalho, K.R. - FIOCRUZ  
> Ana Paula D'Aliancourt Carvalho-Assef - Carvalho-Assef, APD - Fiocruz  
> Liliane Miyuki Seki - Seki, L.M. - FIOCRUZ  
> Paula Faro de Almeida Motta - Motta, P.F.A. - Fiocruz  
> Maria da Penha A. Herkenhoff de Souza - Souza, M.P.A.H. - LACEN-ES  
> Carlene de Fátima Moraes Alves - Alves, C.F.M. - LACEN-MG  
> Elvira Maria Loureiro Colnago - Colnago, E.M.L. - LACEN-RJ  
> Larissa Monteiro S. Deliberalli - Deliberalli, L.M.S. - LACEN-GO  
> Marise Dutra Asensi - Asensi, M.D. - Fiocruz

## APÊNDICE C

# Certificado



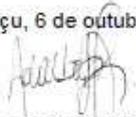
**26º**  
Congresso Brasileiro  
**Microbiologia**  
2 a 6 de outubro de 2011  
Foz do Iguaçu-PR

**26º Congresso Brasileiro de Microbiologia**  
de 2 a 6 de outubro de 2011  
Rafain Palace Hotel e Convention Center  
Foz do Iguaçu - Parana

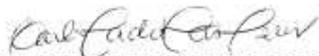
II Encontro Nacional de Professores de Microbiologia - ENAPROM  
International Society for Microbial Ecology - Latin America ISME Symposium 2011  
Simposio Internacional de Bacterias Lácticas  
IV Simposio de Coleções de Culturas

Certificamos que o trabalho intitulado **DISSEMINAÇÃO DE GENÓTIPOS MULTIRRESISTENTES DE ACINETOBACTER BAUMANNII PRODUTORES DE CARBAPENEMASE OXA-23 EM DIFERENTES ESTADOS DO BRASIL**, com a autoria de: **CARVALHO, KR, CHAGAS, TPG, DOS SANTOS, VMRC, CHANG, MR, DE ALMEIDA, R, DE SOUZA, MPAH, PIA, M, ALVES CFM, SOUZA, ALS, BARROSO, IMO, RUF, HR, VALE, AKS, BERTONCINI, R, JÚNIOR, CF, CARVALHO-ASSEF, APDA, ASENSI, MD** foi apresentado na forma de pôster durante o **26º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA – CBM 2011** em 03 de outubro de 2011, em Foz do Iguaçu.PR.

Foz do Iguaçu, 6 de outubro de 2011



**Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior**  
Presidente



**Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves**  
1ª Secretária

Organização



**SBM** Sociedade Brasileira de Microbiologia

## APÊNDICE D

# Certificado

**26º**  
Congresso Brasileiro  
**Microbiologia**  
2 a 6 de outubro de 2011  
Foz do Iguaçu-PR

**26º Congresso Brasileiro de Microbiologia**  
de 2 a 6 de outubro de 2011  
Rafain Palace Hotel e Convention Center  
Foz do Iguaçu - Parana

II Encontro Nacional de Professores de Microbiologia - ENAPROM  
International Society for Microbial Ecology - Latin America ISME Symposium 2011  
Simposio Internacional de Bactérias Láticas  
IV Simposio de Coleções de Culturas

Certificamos que o trabalho intitulado **MULTILOCUS VARIABLE-NUMBER OF TANDEM REPEATS ANALYSIS AS AN AID FOR MOLECULAR TYPING AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF ACINETOBACTER BAUMANNII**, com a autoria de: CARRAMASCHI, I N., CRUZ, J G V., CARVALHO, K R., ASENSI, M D., ZAHNER, V. foi apresentado na forma de pôster durante o 26º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA – CBM 2011 em 03 de outubro de 2011, em Foz do Iguaçu.PR.

Foz do Iguaçu, 6 de outubro de 2011

**Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior**  
Presidente

**Profa. Dra. Carla Taddei de Castro Neves**  
1º Secretário

Organização

## APÊNDICE E





## Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*<sub>OXA-23</sub> collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil

Karyne Rangel Carvalho<sup>a,\*</sup>, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef<sup>a</sup>, Gisele Peirano<sup>a</sup>, Lia Cristina Galvão dos Santos<sup>b</sup>, Maria José Felix Pereira<sup>a</sup>, Marise Dutra Asensi<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP: 21040-360, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Bonsucesso General Hospital, Av. Londres 616, Bonsucesso, Rio de Janeiro, CEP: 21041-030, RJ, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 August 2008

Received in revised form 4 December 2008

Accepted 4 December 2008

#### Keywords:

Multidrug resistance  
*Acinetobacter baumannii*  
OXA-23  
Molecular typing

### ABSTRACT

The present study reports the dissemination of multidrug-resistant (MDR) OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clones throughout hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. A total of 110 imipenem-resistant *A. baumannii* isolates were obtained from January 2006 to September 2007 in eight hospitals. The modified Hodge test was performed to screen for carbapenemase production. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing were performed for the detection of *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> and the class 1 integron. Isolates were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) following digestion with *Apal*. All the isolates were MDR and 96 (87.3%) produced the carbapenemase OXA-23. No isolates produced OXA-24, OXA-58 or the metallo- $\beta$ -lactamases IMP and VIM. The class 1 integron was absent in all isolates. The *A. baumannii* isolates were separated into five genotypes, with the highest prevalence of genotype A (71.8%) followed by genotype B (22.7%). Genotype A was present in seven hospitals, whilst genotype B had spread in five hospitals. The OXA-23-producing isolates belonged to all genotypes. The presence of MDR OXA-23-producing *A. baumannii* in different hospitals in Rio de Janeiro emphasises the need to control the use of carbapenems and to prevent the spread of these organisms in Rio de Janeiro.

© 2009 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Acinetobacter baumannii* is recognised as an important opportunistic Gram-negative pathogen frequently associated with nosocomial outbreaks worldwide [1]. *Acinetobacter baumannii* has become particularly problematic in Brazil because of its prevalence and resistance patterns. According to the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) reports, *A. baumannii* was the second most prevalent pathogen isolated from hospitalised patients at seven Intensive Care Units (ICUs) in four Brazilian cities and presented elevated resistance rates to all antimicrobials [2].

Carbapenems generally represent the last resort in treating life-threatening infections caused by *Acinetobacter* spp. because of their stability against most  $\beta$ -lactamases, including extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, however their efficacy is increasingly compromised by the emergence of carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase enzymes of Ambler molecular class B (metallo- $\beta$ -lactamases) and D (oxacillinases) [3,4].

The OXA-type carbapenemases have emerged globally as the main mechanism responsible for this resistance. Recently, the number of OXA-type carbapenemases has increased substantially and they have been divided into eight subgroups of enzymes, four of them identified in *A. baumannii*: OXA-23-like (OXA-23, OXA-27 and OXA-49); OXA-24-like (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 and OXA-72); OXA-58; and OXA-51-like. The latter group constitutes a family of chromosomal enzymes typically present in *A. baumannii* [5].

Outbreaks of OXA-23-producing *Acinetobacter* have been reported from various regions of the world [6–9]. Although multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter* spp. are a leading cause of nosocomial infections in Brazilian hospitals, there are few studies regarding the mechanisms of resistance to carbapenems. Dalla-Costa et al. [7] reported an outbreak of carbapenem-resistant *A. baumannii* producing the OXA-23 enzyme in two hospitals in Curitiba. Villegas et al. [10] also described an outbreak of *A. baumannii* clones producing OXA-23 in Colombia, another country in Latin America.

Because multidrug resistance among hospital pathogens is such a serious problem in some parts of Brazil, polymyxin, a highly toxic antimicrobial agent used until the early 1980s to treat infections caused by Gram-negative rods, is again being used to treat infections caused by isolates of *Acinetobacter* susceptible only to this compound.

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 2270 6565/2598 4277; fax: +55 21 2270 6565/2598 4277.

E-mail address: [karynecr@ioc.fiocruz.br](mailto:karynecr@ioc.fiocruz.br) (K.R. Carvalho).

The present study reports the dissemination of MDR OXA-23-producing *A. baumannii* clones throughout hospitals in Rio de Janeiro, Brazil.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial isolates

From January 2006 to September 2007, 110 clinical isolates of *A. baumannii* showing resistance to imipenem on the basis of the results of disk diffusion tests were collected from eight hospitals (four public and four private) in Rio de Janeiro, Brazil. Bacterial isolates were obtained from respiratory tract secretions (47.3%), blood (16.4%), catheter (9.1%), skin wounds (6.4%), urine (3.6%) and other sites (17.2%). Most of the isolates (59.1%) were obtained from patients admitted to the ICU. Seven control isolates obtained at the same time from other patients at three of the hospitals studied were susceptible to carbapenems, with minimum inhibitory concentrations (MICs) of 0.5–2 µg/mL for imipenem and meropenem.

Isolates were identified by conventional techniques and automated systems, including the Vitek system (bioMérieux Vitek Systems Inc., Hazelwood, MO). Genomic species of *Acinetobacter* spp. were confirmed by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) [11]. Polymerase chain reaction (PCR) products of 16S rRNA genes were digested with *DdeI* (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA), *AluI* (Gibco Invitrogen), *MspI* (Biolabs, Beverly, MA), *NciI* (Biolabs) and *HinP11* (Biolabs). ARDRA profiles, defined as the combination of the restriction patterns obtained with the respective enzymes, were interpreted according to the scheme of Dijkshoorn et al. [12]. Isolates were kept frozen at –20 °C in tryptic soy broth containing 20% glycerol (v/v) until further testing.

### 2.2. Antimicrobial susceptibility testing

The disk diffusion method was employed to evaluate susceptibility to the following antimicrobial agents: amikacin; aztreonam; cefepime; ceftazidime; ciprofloxacin; meropenem; ampicillin/sulbactam; piperacillin/tazobactam and sulfamethoxazole/trimethoprim. MIC values of imipenem, meropenem, tigecycline and polymyxin B were determined by Etest (AB BIODISK, Solna, Sweden) using Mueller–Hinton agar. Results were analysed as described by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [13]. Since there are no breakpoints available for tigecycline for *Acinetobacter* spp., US Food and Drug Administration (FDA) tigecycline breakpoints listed for Enterobacteriaceae ( $\leq 2$ , 4 and  $\geq 8$  µg/mL for susceptible, intermediate and resistant strains, respectively) were applied to the *Acinetobacter* spp. in this study. These FDA breakpoints have also been used for *Acinetobacter* spp. in several recent studies [14,15]. Current quality control testing was performed using the following organisms: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25923. Results were compared with CLSI MIC ranges [13]. To evaluate the inactivation of imipenem by carbapenemases, imipenem-resistant *A. baumannii* (IRAB) isolates were screened by the modified Hodge test [16].

### 2.3. PCR amplification and sequencing

Total genomic DNA of the isolates was extracted as described previously [17]. Genes coding for class B and D carbapenemases and the class 1 integron were sought by PCR using *Taq* polymerase with primers specific for *bla*<sub>OXA-23</sub>-like, *bla*<sub>OXA-40</sub>-like, *bla*<sub>OXA-58</sub>-like, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and the conserved regions of the integron (5'-CS and 3'-CS). An attempt to detect metallo-β-lactamases was performed by PCR amplification using primers IMP1-F (5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3'), IMP1-R (5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3'), VIM2-F

(5'-GTTTGGTTCGCATATCGCAAC-3') and VIM2-R (5'-CTACTCAACGACTGAGCGATTTGT-3'), following previously described conditions [18]. Amplification of the genes encoding oxacillinases was carried out with PCR using the following primers: OXA23-F (5'-ACTTGCTATGTGGTTGCTTCTC-3') and OXA23-R (5'-TGTCAAGCTCTTAAATAAT-ATTCAGC-3') [8]; OXA24-F (5'-CAAGGACTGGCCTAGAG) and OXA24-R (5'-ATTAGCTTGCTCCACCCAAC) (this work); and OXA58-F (5'-CGATCAGAATGTTCAAGCGC) and OXA58-R (5'-ACGATTCCCCTCTGCGC) [8]. The gene cassettes inserted in the variable regions of the class 1 integron were amplified using the primer pairs 5'-CS (5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3') and 3'-CS (5'-AAGCAGACTTGACTGA-3') [19]. PCR products were purified using a GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). DNA sequencing was performed by the dideoxy chain terminator method with Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analysed using an ABI Prism 3100 genetic analyser (Applied Biosystems). Similarity searches and alignments for both the nucleotide sequences were performed with the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### 2.4. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Isolates were typed by PFGE [20] following digestion of intact genomic DNA with *Apal* (Invitrogen). DNA fragments were separated on 1% (w/v) agarose gels in 0.5% TBE [Tris–borate–ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)] buffer using a CHEF DRIII apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA) with 6V/cm, pulsed from 5 s to 15 s, for 18 h at 14 °C. Gels were stained with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light. The *Apal* restriction profiles were initially compared by visual inspection according to the criteria of Tenover et al. [21]. Computer-assisted analysis was also performed using BioNumerics v.4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Comparison of the banding patterns was accomplished by the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) using the Dice similarity coefficient.

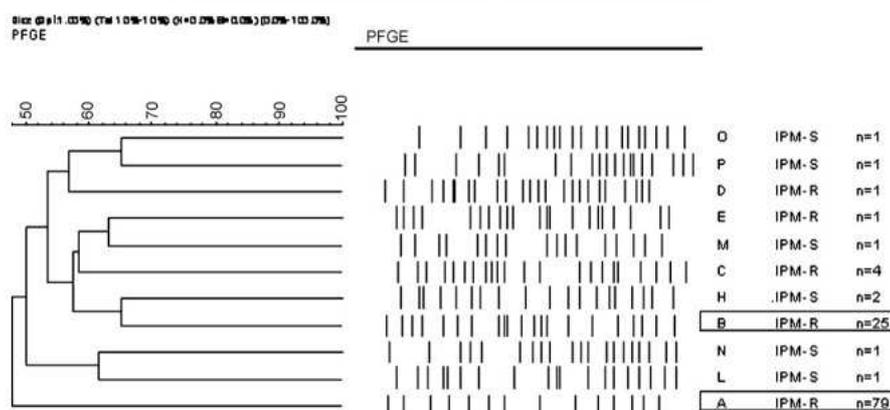
## 3. Results and discussion

According to the results of the antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion for 110 IRAB isolates, all antimicrobials tested showed a high resistance rate. Ampicillin/sulbactam showed the highest susceptibility rate (17.3%;  $n = 19$ ), followed by amikacin

**Table 1**  
Susceptibility pattern of 110 imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates to 12 antimicrobial agents.

Antimicrobial	Disk diffusion [n (%)]		
	S	I	R
Amikacin	15 (13.6)	1 (0.9)	94 (85.5)
Ampicillin/sulbactam	19 (17.3)	22 (20.0)	69 (62.7)
Aztreonam	0	1 (0.9)	109 (99.1)
Ceftazidime	0	0	110 (100)
Cefepime	0	1 (0.9)	109 (99.1)
Ciprofloxacin	0	0	110 (100)
Meropenem	1 (0.9)	0	109 (99.1)
Piperacillin/tazobactam	0	0	110 (100)
Sulfamethoxazole/trimethoprim	2 (1.8)	0	108 (98.2)
	MIC <sub>50</sub> (µg/mL)		MIC <sub>90</sub> (µg/mL)
Imipenem	>32		>32
Meropenem	>32		>32
Tigecycline	3.0		4.0
Polymyxin B	1.0		2.0

S, susceptible; I, intermediate; R, resistant; MIC<sub>50/90</sub>, minimum inhibitory concentration for 50% and 90% of the organisms, respectively.



**Fig. 1.** Dendrogram resulting from computer analysis of the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of *Acinetobacter baumannii* isolated in eight hospitals. *Acinetobacter baumannii* genotypes and number of isolates resistant (IPM-R) or susceptible (IPM-S) to imipenem are indicated. The two prevalent imipenem-resistant OXA-23-producing genotypes are boxed. The scale represents the average percentage similarity.

(13.6%;  $n = 15$ ) (Table 1). By MIC results, all isolates were highly resistant to imipenem and meropenem (MIC > 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) except for one isolate that showed a MIC of 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for meropenem. The isolates were susceptible to polymyxin B (MICs of < 0.25–2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), with MICs for 50% and 90% of the organisms (MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values) of 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values of tigecycline (3.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively) were above the intermediate breakpoint, with a range of 1.0–4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Table 1).

Higher MIC values of tigecycline have been reported in MDR *A. baumannii* isolates [22,23]. These results suggest that tigecycline may be of limited clinical utility for the treatment of infections involving these isolates.

Using the modified Hodge test, the presence of carbapenemases was detected in 97 (88.2%) of the IRAB isolates. By PCR and DNA sequencing of the PCR product, 96 isolates (87.3%) were positive for the presence of *bla*<sub>OXA-23</sub> and none were positive for *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and the class 1 integron. As described previously, none of the *Acinetobacter* OXA genes from carbapenem-resistant strains have been found on integrons [24].

The screening test (modified Hodge test) showed good correlation with PCR; 85 (87.6%) of 97 carbapenemase-positive isolates were OXA-23 producers. However, 11 OXA-23-producing isolates were negative in the screening test. The other 12 carbapenemase-positive isolates gave no amplification in PCR of *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-40</sub>,

*bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> and *bla*<sub>VIM</sub>, suggesting the presence of other carbapenemase genes or a false-positive result. The modified Hodge test is a simple method of screening for carbapenemase production but occasional false-positives have been reported in the literature [25].

To determine the genomic diversity of IRAB, isolates were analysed by macrorestriction profile analysis following PFGE. Five genotypes with 65% maximum similarity were observed. The seven carbapenem-susceptible control isolates belonged to different genotypes from the carbapenem-resistant strains (Fig. 1). Genotype A (71.8% of isolates;  $n = 79$ ) was the most prevalent and was found at seven hospitals. These isolates present high rates of resistance to antimicrobials and 95% were resistant to all seven antimicrobial groups tested. Genotype B (22.7% of isolates;  $n = 25$ ) was circulating at five hospitals and was resistant to at least five different groups of antimicrobials tested. The isolates belonging to genotype C (3.6% of isolates;  $n = 4$ ), D and E (each represented by a single isolate) showed resistance to all antimicrobial groups tested. The OXA-23-producing isolates belonged to genotypes A ( $n = 66$ ; 83.5% of isolates in Group A), B ( $n = 24$ ; 96.0%), C ( $n = 4$ ; 100%), D ( $n = 1$ ; 100%) and E ( $n = 1$ ; 100%) (Table 2).

OXA-type carbapenemase-producing *A. baumannii* are increasingly widespread, with reports from Africa [26], Europe [27], Oceania [28], Asia [29], China [30] and South America [7]. This study revealed that OXA-23 carbapenemase was present in *A. bau-*

**Table 2**  
Characterisation of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates harbouring the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene.

Genotype	Hospital (n)	Antimicrobial resistance patterns (n) <sup>a</sup>	No. of antimicrobial groups resistant to (% of isolates)	Carbapenemase screening test [n (%)]	OXA-23-producers [n (%)]
A (n = 79)	a (17), b (37), c (9), d (1), e (1), g (13), h (1)	AMI, SAM, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, MEM, SXT (n = 57) AMI, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, MEM, SXT (n = 18) SAM, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, MEM, SXT (n = 4)	7 (95) 6 (5)	70 (88.6)	66 (83.5)
B (n = 25)	a (6), b (1), c (1), f (1), g (16)	AMI, SAM, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, MEM, SXT (n = 13) AMI, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, SXT (n = 1) SAM, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, MEM, SXT (n = 9) SAM, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, MEM (n = 2)	7 (56) 5 (8) 6 (36)	22 (88.0)	24 (96.0)
C (n = 4)	b (1), g (3)	AMI, SAM, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, MEM, SXT (n = 4)	7 (100)	3 (75.0)	4 (100)
D (n = 1)	c (1)	AMI, SAM, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, MEM, SXT (n = 1)	7 (100)	1 (100)	1 (100)
E (n = 1)	b (1)	AMI, SAM, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, MEM, SXT (n = 1)	7 (100)	1 (100)	1 (100)
Total				97 (88.2)	96 (87.3)

AMI, amikacin; SAM, ampicillin/sulbactam; TZP, piperacillin/tazobactam; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; CIP, ciprofloxacin; MEM, meropenem; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim.

<sup>a</sup> Intermediate were considered resistant in this analysis.

*mannii* isolates in Rio de Janeiro, Brazil. *Acinetobacter baumannii* isolates carrying the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene were previously documented in another Brazilian location and in another Latin American country [7,10]. Similar to those in the present study, such isolates usually exhibit high levels of resistance to antimicrobials, creating a serious problem for choice of therapy. Elsewhere in the world, the emergence of such a resistance mechanism in *Acinetobacter* spp. isolates represents a worrying trend in carbapenem resistance.

For infections caused by carbapenem-resistant *A. baumannii* in the hospitals studied, patients received intravenous polymyxin B for bloodstream and urinary infections, whilst the combination of intravenous polymyxin B and tigecycline was administered for respiratory tract infections, and intravenous tigecycline for skin and soft-tissue infections. Despite clinical treatment, there was no correlation between the antimicrobial agent used and clinical outcome. It has therefore been argued that the mortality observed in patients with *A. baumannii* infections is caused by their underlying disease rather than as a consequence of *A. baumannii* infection [31].

In the present study, the OXA-23-producers included both non-clonal and clonal isolates. On the basis of PFGE patterns, it appears that two predominant genotypes of OXA-23-producing MDRA. *baumannii* had spread between public and private hospitals in Rio de Janeiro. The occurrence of common PFGE types among OXA-23-producing *A. baumannii* from different hospitals in Rio de Janeiro suggests that dissemination of isolates plays an important role in the increase of IRAB. This dissemination could be explained by transfer of infected or colonised patients and/or sharing of common healthcare staff. In this way, the presence of MDR OXA-23-producing *A. baumannii* genotypes emphasises the need to control the use of carbapenems and to prevent the spread of these organisms in Rio de Janeiro.

#### Acknowledgments

The authors thank all hospital participants who collected isolates for the study as well as PDTIS-IOC platform for DNA sequencing.

**Funding:** This work was supported by grants from FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) and Instituto Oswaldo Cruz–FIOCRUZ.

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

#### References

- Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977–2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:284–95.
- Mendes C, Oplustil C, Sakagami E, Turner P, Kiffer C; MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002. *Braz J Infect Dis* 2005;9:44–51.
- Livermore DM. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3:218–24.
- Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 2002;3:117–27.
- Walter-Rasmussen, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:373–83.
- Naas T, Levy M, Hirschauer C, Marchandin H, Nordmann P. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J Clin Microbiol* 2005;43:4826–9.
- Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Braganholo KL, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003;41:3403–6.
- Jeong SH, Bae IK, Park KO, An YJ, Sohn SG, Jang SJ, et al. Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. *J Microbiol* 2006;44:423–31.
- Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:627–32.
- Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2001–4.
- Vanechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1995;33:11–5.
- Dijkshoorn L, van Harselaar B, Tjernberg I, Bouvet PJM, Vanechoutte M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Syst Appl Microbiol* 1998;21:33–9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th informational supplement. M100-S18. Wayne, PA: NCCLS, 2008.
- Jones RN, Ferraro MJ, Reller LB, Schreckenberger PC, Swenson JM, Sader HS. Multicenter studies of tigecycline disk diffusion susceptibility results for *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2007;45:227–30.
- Tan TY, Ng LS. Susceptibility of multi-resistant Gram-negative bacilli in Singapore to tigecycline as tested by agar dilution. *Ann Acad Med Singapore* 2007;36:807–10.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:88–91.
- Caetano-Anollés G, Cresshoff PM, editors. Characterization and classification of microbes by Rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. DNA markers: protocols, applications and overviews. New York, NY: John Wiley and Sons; 1997. p. 151–71.
- Kimura S, Alba J, Shiroto K, Sano R, Niki Y, Maesaki S, et al. Clonal diversity of metallo- $\beta$ -lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. *J Clin Microbiol* 2005;43:458–61.
- Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:185–91.
- Romão CM, Faria YN, Pereira LR, Asensi MD. Susceptibility of clinical isolates of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100:541–8.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial isolate typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–9.
- Navon-Venezia S, Leavitt A, Carmeli Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007;4:772–4.
- Peleg AY, Potoski BA, Rea R, Adams J, Sethi J, Capitano B, et al. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:128–31.
- Brown S, Amyes S. OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:1–3.
- Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem–EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003;41:4623–9.
- Corvec S, Poirel L, Drugeon H, Nordmann P. Genetics of acquisition and expression of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*<sub>OXA-23</sub> in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1530–3.
- Marqué S, Poirel L, Héritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R, et al. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol* 2005;43:4885–8.
- Valenzuela J, Thomas L, Partridge S, van der Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell J. Horizontal gene transfers within a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2007;45:453–60.
- Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23  $\beta$ -lactamase in Korea. *J Clin Microbiol* 2005;43:2241–5.
- Yu YS, Yang Q, Xu XW, Kong HS, Xu GY, Zhong BY. Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*–*baumannii* complex in a Chinese hospital. *J Med Microbiol* 2004;53:653–6.
- Dijkshoorn L, Nemeč A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:939–51.

## OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro?

Filipa Grosso<sup>1</sup>, Karyne Rangel Carvalho<sup>2</sup>, Sandra Quinteira<sup>1,3</sup>, Ana Ramos<sup>1</sup>, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef<sup>2</sup>, Marise Dutra Asensi<sup>2</sup> and Luísa Peixe<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal; <sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>3</sup>Centro de Investigação em Tecnologias da Saúde (CITS)/IPSN (CESPU), VN Famalicão, Portugal

\*Corresponding author. Tel: +351-222078946; Fax: +351-222003977; E-mail: lpeixe@ff.up.pt

Received 2 August 2010; returned 16 September 2010; revised 28 September 2010; accepted 4 October 2010

**Objectives:** This study focused on the population structure of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Rio de Janeiro, Brazil.

**Methods:** The analysis included several genomic typing methods, including PFGE, two multilocus sequence typing (MLST) schemes, sequence group (SG) determination and *bla*<sub>OXA-51-like</sub> sequencing. The genomic context of the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene was also evaluated using I-CeuI hybridizations and PCR assays.

**Results:** Congruent clustering was obtained revealing four lineages. In accordance, four new sequence types (STs) (ST131, ST132, ST133 and ST134) were obtained with the MLST-OD scheme (associated with the Oxford Database) and four (ST79, ST15 and two new allelic profiles) with the MLST-IP scheme (developed by the Institute Pasteur). Four SGs (SG1, SG4 and two new profiles) were identified, allowing the association of 70% of the isolates with European clone II. *bla*<sub>OXA-51-like</sub> sequencing revealed the presence of *bla*<sub>OXA-66</sub>, *bla*<sub>OXA-69</sub>, *bla*<sub>OXA-95</sub> and *bla*<sub>OXA-132</sub>.

**Conclusions:** Identification of new STs together with new SG profiles are findings suggestive of a local diversity hotspot that is worth exploring.

**Keywords:** *bla*<sub>OXA-23</sub>, PFGE, MLST, sequence groups, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>

### Introduction

In recent years, Brazil has faced the emergence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with some reports implicating the production of OXA-23 as the main carbapenem resistance mechanism.<sup>1–3</sup>

Although several methodologies have been proposed for assessing the genomic diversity of carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) isolates, the recently developed multilocus sequence typing (MLST) seems to represent a reliable tool for providing consistent data on its epidemiology, especially due to the possibility of results being compared between different laboratories by easy access to international databases.<sup>4,5</sup> Recent MLST studies on the clonal diversity of *bla*<sub>OXA-23</sub>-carrying isolates revealed their association mainly with sequence type (ST) 92 (formerly designated ST22) and with European clone II (EU-II).<sup>6,7</sup> A single description of an OXA-23-producing isolate from Brazil by MLST,<sup>7</sup> and studies reporting genomic diversity among OXA-23-carrying CRAB determined by PFGE,<sup>1,3</sup> constitute the only available information regarding the Brazilian CRAB

population structure. Moreover, the relationship of most of these isolates to the major CRAB lineages disseminated worldwide,<sup>8</sup> namely EU-I, EU-II and EU-III, is still unknown.

The present study reports the characterization of the population structure of a previously published collection of OXA-23-producing *A. baumannii* isolates disseminated throughout Rio de Janeiro, Brazil.<sup>1</sup>

### Material and methods

In this study, 96 OXA-23-producing *A. baumannii* clinical isolates collected between January 2006 and September 2007, from eight hospitals in Rio de Janeiro, Brazil, were included.<sup>1</sup> PFGE typing was performed as previously described,<sup>9</sup> using *Apa*I restriction enzyme, and the patterns obtained were analysed by InfoQuest™ FP version 5.4 software (Bio-Rad Laboratories) with Dice coefficient analysis of peak positions executed. The unweighted-pair group method using average linkages was applied and the bandwidth tolerance was set at 1.5%. Isolates clustering together with >85% level of similarity were considered to belong to the same PFGE type.<sup>10</sup> The PFGE types obtained were additionally

OXA-23-producing *A. baumannii* lineages in Rio de Janeiro

compared with representative isolates that belong to ST92 (mainly OXA-23 producers), ST98 (OXA-40 producers) and ST103 (OXA-58 producers) from Portugal and the Czech Republic (F. Grosso, S. Quinteira and L. Peixe, unpublished results).

One isolate representing each of these PFGE types was selected and submitted to sequence-based typing methods including PCR-based sequence group (SG) identification,<sup>11</sup> *bla*<sub>OXA-51-like</sub> sequencing<sup>12</sup> and two MLST schemes.<sup>4,5</sup> Identification of PCR-based SGs was conducted in order to establish the association with the European *A. baumannii* clones [EU-I (SG2), EU-II (SG1) and EU-III (SG3)].<sup>8,10,11</sup> Sequence-based typing of *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genes was also performed as described previously.<sup>12</sup> MLST analysis was conducted according to two distinct schemes that will be referred to from now on as MLST-OD (associated with the Oxford Database) and MLST-IP (developed by the Institute Pasteur).<sup>4,5</sup> Nucleotide sequences were submitted to the *A. baumannii* MLST databases (MLST-OD, <http://pubmlst.org/abaumannii/>; and MLST-IP, <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html>) for assignment of allele numbers and STs. Isolates with five or more identical alleles (MLST-OD) were considered part of the same clonal complex (CC), according to the eBURST software program (<http://eburst.mlst.net/>).<sup>13</sup> CCs based on MLST-IP were deduced with a minimum spanning tree analysis of *A. baumannii* isolates.<sup>8</sup>

The genetic location of the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene was identified using I-CeuI digestion, transfer and hybridization with specific probes for *bla*<sub>OXA-23</sub> and 16S rRNA.<sup>14</sup> The association of the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene with the composite transposon Tn2006 was determined using a PCR assay.<sup>14</sup>

## Results and discussion

The 96 OXA-23-producing *A. baumannii* were grouped into four PFGE types showing no relationship to representative carbapenem-resistant isolates that belong to ST92, ST98 and ST103 (data not shown). The four clusters arising from PFGE typing were also discerned by sequence-based typing methods. With MLST-OD four new STs were detected: ST131, ST132, ST133 and ST134 (Table 1 and Figure 1). These new allelic profiles were not related to the worldwide-predominant ST92/OXA-23 producers described in several European countries, Korea and China (F. Grosso, S. Quinteira and L. Peixe, unpublished results).<sup>6,7</sup> Moreover, three of the new STs are singletons (Table 1 and Figure 1). ST79, ST15 and two new allelic profiles were detected when MLST-IP was applied (Table 1). The SGs identified were SG1 (the most frequently described among OXA-23-producing isolates),<sup>7</sup> SG4 and two new profiles (Table 1). The *bla*<sub>OXA-51-like</sub> sequencing approach revealed the presence of *bla*<sub>OXA-66</sub> (the most widespread), *bla*<sub>OXA-69</sub>, *bla*<sub>OXA-95</sub> and *bla*<sub>OXA-132</sub> (Table 1).

PFGE type A (70% of the OXA-23-producing isolates found within seven hospitals) was assigned to ST131 (MLST-OD), ST79 (MLST-IP) and SG1, and presented the *bla*<sub>OXA-66</sub> gene. ST131 belongs to CC113, which includes STs found in Argentina (Figure 1). Although belonging to SG1 (EU-II), ST79 is not closely related to either CC2 or ST15. These lineages were described recently as widespread clonal clusters that include most of the CRAB isolates.<sup>8</sup> PFGE type B (25% of isolates) was assigned to ST133 (MLST-OD), ST15 (MLST-IP) and SG4, and presented the *bla*<sub>OXA-132</sub> gene, only previously reported in Saudi Arabian<sup>15</sup> and Portuguese isolates (F. Grosso, S. Quinteira and L. Peixe, unpublished results). The identification of ST15 as an emergent international multidrug-resistant clone<sup>8</sup> and recently reported for another Brazilian OXA-23-producing *A. baumannii*<sup>7</sup> is worthy of note.

**Table 1.** Relationship between PFGE types, STs, *bla*<sub>OXA-51-like</sub> types and SGs obtained for OXA-23-producing *A. baumannii* clinical isolates

Years	No. of hospitals <sup>a</sup>	PFGE type	n <sup>b</sup> (% of isolates)	MLST-OD <sup>d</sup>			MLST-IP <sup>e</sup>			SG (allelic profile)
				allelic profile (ST)	CC	allelic profile (ST)	CC	<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> gene		
2006-07	7	A	67 (70)	1-15-60-10-28-56-32 (131)	CC113	26-2-2-2-29-4-5 (79)	singleton	<i>bla</i> <sub>OXA-66</sub>	1	
2006-07	5	B	24 (25)	12-17-72-1-29-67-39 (133)	singleton	6-6-8-2-3-5-4 (15)	ST15	<i>bla</i> <sub>OXA-132</sub>	4	
2007	2	C	4 (4)	1-12-71-2-1-79-30 (132)	singleton	3-2-2-2-2-4-8 (new 1)	singleton	<i>bla</i> <sub>OXA-95</sub>	new (SG1 <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> + SG2 <i>ompA</i> and SG2 <i>csuE</i> )	
2007	1	D	1 (1)	2-12-73-12-1-9-47 (134)	singleton	3-1-6-2-4-1-5 (new 2)	singleton	<i>bla</i> <sub>OXA-69</sub>	new (SG2 <i>ompA</i> + SG2 <i>bla</i> <sub>OXA-69</sub> )	

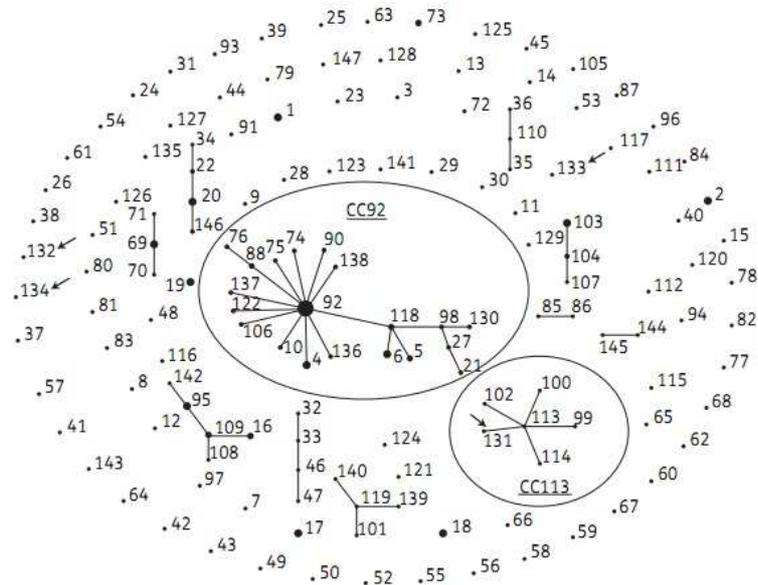
<sup>a</sup>No. of hospitals, total no. of hospitals where each clone was identified.

<sup>b</sup>n, total no. of isolates.

<sup>c</sup>Sequence-based typing methods were performed for four isolates, representative of the four PFGE types.

<sup>d</sup>MLST-OD, MLST scheme developed by Bartual et al.<sup>4</sup>

<sup>e</sup>MLST-IP, MLST scheme developed by Nemeec et al.<sup>5</sup>



**Figure 1.** Clustering of *A. baumannii* STs (MLST-OD) by eBurst, with 185 MLST profiles representing 304 isolates from the database (<http://pubmlst.org/abaumannii/>; 30 June 2010, date last accessed). Each ST is represented as a node (the relative size of each node is indicative of its prevalence among the isolates) and lines connect single-locus variants. CC92 and CC113 are shown in circles. STs determined for isolates from the present study are indicated by arrows.

The representative isolate of PFGE type C (4% of isolates) belonged to ST132 (MLST-OD), revealed new allelic profiles when MLST-IP and SG identification were applied and presented the *bla*<sub>OXA-95</sub> gene. Finally, PFGE type D (1% of the isolates) was assigned to ST134 (MLST-OD), also revealed new allelic profiles with MLST-IP and SG identification, and presented the *bla*<sub>OXA-69</sub> gene (Table 1).

We identified the presence of four unrelated OXA-23-producing *A. baumannii* clonal lineages currently causing infections in Rio de Janeiro hospitals. Interestingly, despite the clonal diversity, the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene was consistently found associated with Tn2006 and was chromosomally encoded in all isolates.

Even considering that the currently used sequence-based typing methods can differ in their intrinsic degree of robustness, a factor that might ultimately impair their discriminatory power, it should be stressed that the observed pattern of results was coherent, independent of the selected methodology, always pinpointing the existence of congruent clusters of isolates characterized by very distinctive features. As the application of these methods becomes more widely established, a process of 'natural selection' will surely narrow down the array of available options, highlighting the advantages and drawbacks of each approach. Simultaneously, further studies will help to validate the applicability of each particular method at both the micro- and the macro-geographical level.

Our results clearly highlighted the clustering of most OXA-23-producing isolates (70%) collected in Rio de Janeiro with EU-II.<sup>7,8,10,11</sup> However, the detection of new STs, together

with new allelic profiles determined by SG identification, suggests a local diversity hotspot that is worth exploring.

## Funding

F. G. is a PhD student from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/31647/2006). This work was also supported by grants from FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) and CNPQ.

## Transparency declarations

None to declare.

## References

- 1 Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*<sub>OXA-23</sub> collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **34**: 25–8.
- 2 Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 3403–6.
- 3 Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection* 2009; **37**: 474–6.
- 4 Bartual SG, Seifert H, Hippler C et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4382–90.

OXA-23-producing *A. baumannii* lineages in Rio de Janeiro

- 5** Nemeč A, Krizová L, Maixnerová M et al. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**: 484–9.
- 6** Fu Y, Zhou J, Zhou H et al. Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 22 in multiple cities of China. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 644–50.
- 7** Mugnier PD, Poiré L, Naas T et al. Worldwide dissemination of the *bla*<sub>OXA-23</sub> carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010; **16**: 35–40.
- 8** Diancourt L, Passet V, Nemeč A et al. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 2010; **5**: e10034.
- 9** Quinteira S, Grosso F, Ramos H et al. Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3465–6.
- 10** Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2007; **14**: 161–7.
- 11** Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C et al. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 807–15.
- 12** Evans BA, Hamouda A, Towner KJ et al. OXA-51-like  $\beta$ -lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 268–75.
- 13** Feil EJ, Li BC, Aanensen DM et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 2004; **186**: 1518–30.
- 14** Corvec S, Pairel L, Naas T et al. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*<sub>OXA-23</sub> in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1530–3.
- 15** Alsultan A, Hamouda A, Evans BA et al. *Acinetobacter baumannii*: emergence of four strains with novel *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genes in patients with diabetes mellitus. *J Chemother* 2009; **21**: 290–5.

## Occurrence of *bla*<sub>OXA-23</sub> gene in imipenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*

Karyne Rangel Carvalho<sup>1/+</sup>, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef<sup>1</sup>, Lia Galvão dos Santos<sup>2</sup>, Maria José Félix Pereira<sup>3</sup>, Marise Dutra Asensi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Hospital Federal de Bonsucesso, Rio de Janeiro, RJ, Brasil <sup>3</sup>Rede Labs D'Or, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

The aim of the current study was to describe the occurrence of the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene and the IS*Aba1* element in imipenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* strains. By performing the polymerase chain reaction mapping using combinations of IS*Aba1* forward primers and the *bla*<sub>OXA-23-like</sub> gene reverse primers, we demonstrated that the IS*Aba1* element did not occur upstream of the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene in five of 31 isolates, which explained the lack of resistance to imipenem despite the presence of the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene. All of the *bla*<sub>OXA-23</sub>-positive isolates were susceptible to imipenem and meropenem with minimal inhibitory concentration  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ . Pulsed-field gel electrophoresis analysis revealed four genotypes among the five *bla*<sub>OXA-23</sub>-positive isolates. The current report of the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene in imipenem-susceptible isolates provided evidence that this gene may be silently spread in a hospital environment and highlighted the threat of undetected reservoirs of carbapenemase genes.

Key words: imipenem-susceptible - *Acinetobacter baumannii* - *bla*<sub>OXA-23</sub>

Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is predominantly caused by the carbapenem-hydrolysing class D  $\beta$ -lactamases (CHDLs). Sequence-based comparisons classify OXA-carbapenemases into eight subgroups as follows: four of the OXA-carbapenemases have been identified in *A. baumannii*, namely, OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like and OXA-143, which is a novel plasmid-mediated CHDL (Higgins et al. 2009). OXA-23 was identified as the first member of this enzyme group in 1985 in Scotland, which was before the wide availability of imipenem in clinical practice. Since 1985, a number of outbreaks of OXA-23-producing imipenem-resistant *Acinetobacter* spp have been reported worldwide (Mugnier et al. 2010). The OXA-23-encoding gene is mainly found on plasmids and has been associated with the IS*Aba1* or IS*Aba4* elements (Corvec et al. 2007). The IS*Aba1* or IS*Aba4* element that is upstream of *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genes provide promoter sequences that enhance their expression (Corvec et al. 2007). IS*Aba1* regulates *bla*<sub>OXA-23</sub> mobility and has two copies that surround the  $\beta$ -lactamase gene and form a composite transposon (defined as Tn2006) (Mugnier et al. 2010). IS*Aba4* belongs to the IS982 family, is 975 bp in length, possesses two 18-bp inverted repeats and encodes a 292-amino-acid putative transposase. These insertion elements may be involved in transposition processes at the origin of acquisition of the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene (Corvec et al. 2007).

The current study described the silent carriage of the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene in five imipenem-susceptible *A. baumannii* isolates.

From April 2005-September 2007, 31 clinical isolates of imipenem-susceptible *A. baumannii* were collected from non-related patients at five hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. The isolates were identified using conventional techniques and confirmed using the amplified ribosomal DNA restriction analysis (Carvalho et al. 2009) and *bla*<sub>OXA-51</sub> polymerase chain reaction (PCR) (Turton et al. 2006b).

Among the 31 imipenem-susceptible isolates, five were positive for *bla*<sub>OXA-23</sub> by PCR and DNA sequencing using the following primers: OXA-23 F (5'-ACTTGC-TATGTGGTTGCTTCTC-3') and OXA-23-R (5'-TGT-CAAGCTCTAAATAATATTACAGC-3'), which annealed at the region between 987 and 1,778-bp positions in GenBank isolate AJ132105 (Higgins et al. 2009). In addition, these isolates were positive for IS*Aba1* (IS*Aba1* F: 5'-CACGAATGCAGAAGTTG-3' and IS*Aba1* R: 5'-CGACGAATACTATGACAC-3') (Turton et al. 2006a) but negative for IS*Aba4* (IS*Aba4* F 5'-ATTTGAACCCATCTATTGGC-3' and IS*Aba4* R 5'-ACTCTCAT-ATTTTTCTTGG-3') (Corvec et al. 2007). The nucleotide sequences of *bla*<sub>OXA-23</sub> and IS*Aba1* have already been deposited in the GenBank under the accessions JF421124 and JF340121, respectively.

PCR mapping using the combination of the IS*Aba1* forward primer and the *bla*<sub>OXA-23-like</sub> reverse primer were negative. In five carbapenem-resistant control isolates, the IS*Aba1* element was detected upstream of the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene (Carvalho et al. 2009).

According to antimicrobial susceptibility tests, such as the E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) and the agar dilution method, all *bla*<sub>OXA-23</sub>-positive imipenem-susceptible isolates were susceptible to imipenem and meropenem [minimal inhibitory concentration (MIC)  $\leq 4 \mu\text{g/}$

Financial support: FAPERJ, IOC-FIOCRUZ  
+ Corresponding author: karynerc@ioc.fiocruz.br  
Received 30 September 2010  
Accepted 5 May 2011

mL]. These results may be explained by the absence of the *ISAbal* element upstream of the *bla*<sub>OXA-23-like</sub> gene.

All 31 isolates were susceptible to polymyxin B (MIC  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$ ). Using the disk diffusion method, four isolates were non-susceptible (i.e., intermediate or resistant) to aztreonam, ceftazidime, cefepime and ciprofloxacin, whereas three isolates were susceptible to ampicillin-sulbactam and amikacin. These findings suggest the presence of another resistance mechanism that has not been previously investigated, such as extended spectrum beta lactamases, the modification of penicillin-binding proteins and porins or the upregulation of the efflux system (Zarrilli et al. 2009).

Macrorestriction with *ApaI*-digestion following pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used to determine the genetic relatedness of the *bla*<sub>OXA-23</sub>-positive isolates. The *bla*<sub>OXA-23</sub>-positive isolates were clustered into four different genotypes (B, C, G and I). The criteria for the classification of DNA band patterns included the following: undistinguishable (clonally related isolates), closely related (clonal variants,  $\leq 3$  different bands), possibly related (4-6 different bands) and unrelated ( $\geq 6$  different bands) (Tenover et al. 1995). Two isolates proved to be genetically related (genotype C). Except for genotype I, all of the genotypes were detected among *bla*<sub>OXA-23</sub>-negative isolates. Genotypes B and C were detected among imipenem-resistant *A. baumannii* isolates as described previously (Carvalho et al. 2009). Chromosomally encoded *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genes have been described in carbapenem-susceptible *Acinetobacter radioresistens* isolates, suggesting that this species is a source of these genes (Poirel et al. 2008, Boo & Crowley 2009, Mendes et al. 2009). Poirel et al. (2008) has identified a similar plasmid backbone in several *bla*<sub>OXA-23</sub>-positive *A. baumannii* and *A. radioresistens* isolates. These results suggest that a plasmid-mediated *ISAbal* element originating from *A. baumannii* may have entered *A. radioresistens* to be transposed and targeted to the regions that are upstream and downstream of the chromosomal *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genes. A transposon-like structure is then formed, which enhances the expression of the *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genes. This structure may transpose and target a plasmid inside the *A. radioresistens* genome and, finally, this plasmid conjugates into *A. baumannii* to spread the resistance determinant in the latter species (Poirel et al. 2008).

The current report of *bla*<sub>OXA-23</sub> in imipenem-susceptible *A. baumannii* isolates provided evidence that the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene may be silently spread in a hospital environment and highlighted the threat of undetected reservoirs of carbapenemase genes. The undetected carbapenemase genes are challenging, because the laboratory detection of such genes and the subsequent measures

for infection control in hospital settings generally target only phenotypically multidrug-resistant organisms. The future control of multidrug resistance may require the identification of multidrug-resistant isolates and their reservoirs using molecular-based techniques.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To all hospital participants who collected isolates for the study, and to PDTIS-IOC platform, for DNA sequencing.

#### REFERENCES

- Boo TW, Crowley B 2009. Detection of *bla*<sub>OXA-58</sub> and *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genes in carbapenem-susceptible *Acinetobacter* clinical isolates: should we be concerned? *J Med Microbiol* 58: 839-841.
- Carvalho KR, APD'A Carvalho-Assef, Peirano G, dos Santos LCG, Pereira MJF, Asensi MD 2009. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*<sub>OXA-23</sub> collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 34: 25-28.
- Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P 2007. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*<sub>OXA-23</sub> in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 1530-1533.
- Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H 2009. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 5035-5038.
- Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Deshpande LM, Jones RN 2009. Codetection of *bla*<sub>OXA-23</sub> gene (*bla*<sub>OXA-133</sub>) and *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter radioresistens*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 843-844.
- Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P 2010. Worldwide dissemination of the *bla*<sub>OXA-23</sub> carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 16: 35-40.
- Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P 2008. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1252-1256.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Pearson DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial isolate typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
- Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL 2006a. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 258: 72-77.
- Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL 2006b. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 44: 2974-2976.
- Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A 2009. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries* 5: 335-341.

APÊNDICE I : Artigo submetido a Mem Inst Oswaldo Cruz “A preliminary molecular epidemiologic study in the analysis of *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) of *Acinetobacter baumannii* OXA-23 producing strains isolated from four different hospitals in Rio de Janeiro”. Carramachi, I N, Carvalho K R, Cruz, J G, Asensi M D, Zahner V.