

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Perfil de susceptibilidade e tipagem molecular de *Acinetobacter* spp.  
multirresistentes em um hospital universitário no sul do Brasil**

Fabiana da Silva Corrêa Soares

Porto Alegre, novembro de 2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FABIANA DA SILVA CORRÊA SOARES

**Perfil de susceptibilidade e tipagem molecular de *Acinetobacter* spp.  
multirresistentes em um hospital universitário no sul do Brasil**

Tese de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Afonso Luís Barth

Porto Alegre, novembro 2006.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Afonso Luís Barth pela oportunidade de orientação, pela paciência e compreensão durante esse tempo.

Ao Dr. Alexandre Prehn Zavascki pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao colegas Laboratório de Microbiologia do Hospital São Lucas da PUCRS, em especial a Silvana, Taisa, Daniela e Juliana, pelo companheirismo.

Ao Dr. Edson Figueiredo, pelo estímulo no início desta jornada.

E a todos que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

Dedico este trabalho aos meus  
pais, Darci e Marlene pelo  
carinho, apoio e amor, vocês  
são os responsáveis por tudo  
que sou, por tudo que  
conquistei e por tudo de bom  
que ainda virá, para mim, vocês  
sempre serão o referencial de  
garra e esperança!  
Ao meu marido Gilson por toda a  
paciência, companheirismo,  
estímulo e amor!  
E principalmente à Luísa, pois  
tudo isso só tem sentido por  
você, minha razão de viver!

Esta conquista, também é de  
você...

### **LISTA DE ABREVIATURAS**

2-MPA	Ácido 2-mercaptopropiônico
BGN-NF	Bacilo Gram-negativo Não-Fermentador
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ESBL	Beta-Lactamases de Espectro Estendido
HSL	Hospital São Lucas
MBL	Metallo-Beta-Lactamases
MDR	Multirresistentes
MH	Mueller-Hinton
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
UTC	Unidade de Tratamento Coronariano
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Revisão.....	12
Tabela 2 – Revisão.....	20
Tabela 1 – Artigo em Inglês.....	44
Tabela 1 – Artigo em Português.....	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Artigo em inglês.....	45
Figura 1 – Artigo em Português.....	55



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1 Taxonomia.....	4
2.2 Epidemiologia.....	7
2.3 Resistência aos antimicrobianos.....	10
2.4 Principais $\beta$ -lactamases de importância clínica.....	13
2.4.1 $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL).....	13
2.4.2 Oxacilinases.....	14
2.4.3 Metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs).....	14
2.5 Métodos de detecção $\beta$ -lactamases em <i>Acinetobacter</i> spp.....	16
2.6 Tipagem molecular de <i>Acinetobacter</i> spp.....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO</b> .....	22
<b>Artigo em Inglês</b> .....	34
<b>Artigo em Português</b> .....	46

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares, causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes, vêm aumentando nos últimos 20 anos, em especial nos países em desenvolvimento. Isto muito provavelmente se deve ao aumento da resistência, durante os anos 70, entre membros da família *Enterobacteriaceae* envolvidas em infecções nosocomiais o qual foi seguido da introdução de novos antibióticos de amplo espectro em hospitais. Como consequência houve um aumento na prevalência de bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose (BGN-NF), incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. *Stenotrophomonas maltophilia* e o complexo *Burkholderia cepacia* como bactérias também causadoras de infecção hospitalar. (1)

Entre os bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose de importância clínica destaca-se o gênero *Acinetobacter*. Esse gênero está amplamente distribuído na natureza e no ambiente hospitalar, sendo entre os BGN-NF o segundo mais comum em infecção hospitalar. As espécies do gênero *Acinetobacter* têm capacidade de sobreviver em locais úmidos e superfícies secas e também pode estar presente em gêneros alimentícios e na pele de pessoas saudáveis. (2)

Geralmente as espécies do gênero são consideradas não patogênicas em indivíduos saudáveis, mas podem causar infecção em pessoas debilitadas. A espécie mais freqüente isolada em humanos é o *Acinetobacter baumannii*, seguido do *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, genoespécie 3 e genoespécie 6.

A habilidade desse microorganismo em adquirir multirresistência e sua alta capacidade de sobreviver em superfícies, tem levado a um aumento das infecções relacionadas ao gênero em hospitais. Entre elas estão as infecções do trato respiratório (mais freqüentemente relacionado ao uso de tubo endotraqueal ou traqueostomia), infecções urinárias, infecções em feridas, e também septicemia. <sup>(1;3;4)</sup>

Há diversos relatos na literatura indicando um aumento no número de casos de *Acinetobacter* spp. como agente de pneumonia nosocomial, particularmente associada à ventilação mecânica em pacientes de unidades de terapia intensiva. São fatores de risco para aquisição de infecção por *Acinetobacter* spp. : tratamento com antibióticos e/ou cirurgia, instrumentação, ventilação mecânica e tempo de permanência em unidades de tratamento intensivo. <sup>(3-5)</sup>

Altas taxas de resistência aos antimicrobianos têm sido observadas em amostras de *Acinetobacter* spp. Estudos multicêntricos, envolvendo hospitais brasileiros, demonstraram que percentuais elevados (80 a 90 %) de *Acinetobacter* spp, são sensíveis somente a carbapenêmicos (imipenem e/ou meropenem) e as polimixinas, e cerca de 10 a 20% são resistentes a todos antimicrobianos disponíveis comercialmente, exceto as polimixinas. <sup>(6;7)</sup>

No ambiente hospitalar, as espécies de *Acinetobacter* spp. encontram-se amplamente distribuídas. Apesar de não estar totalmente elucidado o seu modo de transmissão, algumas fontes de infecção já foram descritas: umidificadores, mãos contaminadas, colchões e cateteres. Um aspecto importante na transmissão de *Acinetobacter* está associado à descontaminação inadequada de equipamentos. Já foi relatado que espécies de *Acinetobacter*

podem persistir no ambiente sob condições úmidas ou secas mantendo-se viáveis por até 5 meses.<sup>(8)</sup>

Espécies de gênero *Acinetobacter* spp. são reconhecidas como patógenos importantes em infecções nosocomiais, frequentemente difíceis de se tratar devido a sua multirresistência aos antimicrobianos e também podem estar envolvidos em muitos surtos. Portanto, é necessário que se consiga entender melhor esses fatos, são indicados métodos de tipagem molecular, as quais são técnicas para comparar amostras (isolados clínicos) de uma mesma espécie, uma vez que os métodos fenotípicos têm baixo poder discriminatório em relação aos genotípicos. Deste modo, a tipagem molecular é um importante instrumento para esclarecer fontes e modo de transmissão de amostras epidêmicas.<sup>(9-11)</sup>

Assim, embora altas taxas de resistência em *Acinetobacter* spp. tenham sido descritas, existe uma diferença de prevalência de resistência conforme determinadas regiões e, portanto, é importante determinar o perfil de suscetibilidade do gênero em cada instituição. Além disso, é importante realizar estudos de tipagem os quais permitam avaliar a epidemiologia molecular dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. para determinar a necessidade de implementação de medidas de controle mais adequadas que dificultem sua transmissão no ambiente hospitalar.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Taxonomia

O gênero *Acinetobacter* apresenta como característica, bacilos curtos ou cocóides que se apresentam normalmente aos pares com tamanho que varia entre 1,0 e 1,5  $\mu\text{m}$  por 1,5 a 2,5 $\mu\text{m}$ . Em meios de cultura sólidos, as colônias normalmente possuem aspecto liso, raramente mucóide, de cor amarelo pálido ou branco-acinzentado, entretanto em algumas amostras podem-se observar pigmento marrom. No meio McConkey, as colônias podem apresentar-se transparentes ou levemente róseas, pois não utilizam a lactose como fonte de carbono. <sup>(3;12)</sup>

As células de *Acinetobacter* são Gram-negativas, não esporulam e são imóveis embora possam apresentar fimbria polar a qual confere apenas um movimento tipo vibratório. São estritamente aeróbios, com metabolismo oxidativo, não fermentativo, catalase positivos e crescem com facilidade entre 33 e 35°C em meio de cultura comuns no laboratório (agar sangue, Mueller-Hinton, McConkey, etc.). Alguns crescem em temperatura acima de 40°C, o que pode diferenciar algumas espécies. <sup>(3;12)</sup>

Todos os membros do gênero apresentam reação negativa no teste da oxidase, característica que pode ser utilizada como um teste presuntivo rápido para distinguir *Acinetobacter* spp. de outros bacilos Gram-negativos não fermentadores. As espécies deste gênero crescem em meios definidos contendo uma única fonte de carbono e pode utilizar sais de amônio e nitrato como fonte única de nitrogênio. <sup>(13)</sup>

Amostras do gênero foram isoladas inicialmente, a partir do solo, em 1909 sendo denominado *Micrococcus calco-aceticus*. <sup>(14)</sup> Diante de características indefinidas referentes ao gênero, durante décadas, vários nomes foram utilizados para distinguir amostras possivelmente pertencente a esse grupo. Em 1968, um estudo demonstrou, que as cepas oxidase negativas eram diferentes das oxidases positivas <sup>(12)</sup> e, em 1971, o “Subcommittee on the Taxonomy of Moraxella and Allied bacteria”, reunido no México, decidiu invalidar toda a sinonímia até então utilizada para o grupo e reconhecer o gênero como *Acinetobacter*. Esse comitê decidiu que o gênero *Acinetobacter* incluiria somente as cepas oxidase negativas e seria composto por uma única espécie: *A. calcoaceticus*. O gênero a partir desse momento pertenceria, provisoriamente, à família *Neisseriaceae*, junto aos gêneros *Moraxella*, *Branhamella* e *Neisseria*.

Na década de oitenta, foram caracterizados 12 grupos de hibridização (genoespécies), foram reconhecidas quatro genoespécies (2, 4, 5 e 7) como espécies e denominadas como *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii* e *A. johnsonii*, respectivamente. Já o *A. calcoaceticus* pertence ao grupo 1 e *A. lwoffii* ao grupo 8 <sup>(15)</sup>.

A partir de estudos de hibridização e seqüenciamento, membros do gênero *Acinetobacter* foram classificados em uma nova família, a *Moraxellaceae*, a qual incluiria os gêneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* e organismos relacionados. <sup>(16;17)</sup>

Devido à dificuldade de diferenciação das cepas sacarolíticas pertencentes às genoespécies 1, 2, 3 e 13 (nova classificação de Tjernberg e Ursing) por meio de provas

fenotípica, utiliza-se com frequência o termo “complexo *A. calcoaceticus* - *baumannii*” ou “*Acinetobacter* sacarolítico”. Já o *A. johnsonii*, *A. lwoffii* e a espécie 12 são assacarolíticos e frequentemente observados como flora de pele. <sup>(18;19)</sup>

Estudos taxonômicos associam métodos fenotípicos, utilização de diversas fontes de carbono e métodos genotípicos de hibridização DNA-DNA, amplificação e clivagem do rDNA e principalmente, o seqüenciamento das regiões 16S e 23S do rRNA, sendo o seqüenciamento o mais utilizado para identificação correta das espécies, atualmente, o gênero *Acinetobacter* pode ser dividido em 25 diferentes genoespécies. <sup>(20-23)</sup>

Atualização da taxonomia das espécies e genoespécies podem ser encontradas no seguinte site: [www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy) (anexo 1).

## 2.2 Epidemiologia

Há mais de 20 anos as infecções adquiridas em hospitais de países em desenvolvimento causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes são um problema muito provavelmente, por consequência da introdução nos hospitais da terapia com antibióticos de amplo espectro. Na década de setenta houve um aumento na importância de bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp, *Stenotrophomonas maltophilia* e o complexo *Burkholderia cepacia* como bactérias também causadoras de infecção hospitalar. <sup>(1)</sup>

Desses patógenos emergentes, o *Acinetobacter* spp., apesar de sua baixa virulência, constitui um sério problema terapêutico devido ao aumento e disseminação de amostras multirresistentes no Brasil e no mundo, tem um papel importante na colonização e infecção de pacientes hospitalizados. <sup>(6;7;24)</sup>

Devido à sua escassa exigência nutricional, o que facilita a sua adaptação ao meio ambiente, espécies do gênero *Acinetobacter* são frequentemente isolados em água, no solo e em esgotos. <sup>(14)</sup> Porém, um estudo demonstrou que a fonte de contaminação com cepas multirresistentes parece não ser a partir de reservatórios comunitários, mas dos existentes no próprio ambiente hospitalar. <sup>(25)</sup>

Os *Acinetobacter* spp. fazem parte da flora da pele, particularmente nas regiões axilares, virilha e dedos dos pés, sendo que 25% de indivíduos normais podem ser colonizados por *Acinetobacter* spp. <sup>(26;27)</sup> Também pode ser encontrado, ocasionalmente, na cavidade oral e trato respiratório de adultos sadios, mas a taxa de pessoas não hospitalizadas portadoras de *Acinetobacter* spp., exceto na pele, é normalmente baixa. <sup>(28)</sup>



Apesar de ser um patógeno oportunista, as espécies do gênero *Acinetobacter* possuem muitos fatores de virulência, como presença de cápsula polissacarídica; presença de fimbrias e/ou do polissacarídeo capsular; produção de enzimas lipídicas, toxicidade do lipopolissacarídeo (LPS), principalmente presença do lipídeo A e a produção do “slime” como fator responsável pelo aumento da virulência e mortalidade. <sup>(1)</sup>

No ambiente hospitalar, tem sido relatado como responsável por bacteremias e septicemia <sup>(29)</sup>, infecções urinárias <sup>(30)</sup>, endocardites <sup>(31)</sup>, meningites <sup>(32)</sup> e infecções em pacientes queimados. <sup>(33)</sup>

Infecções pulmonares hospitalares causadas por *Acinetobacter* spp. têm sido descritas constantemente especialmente quando associadas à ventilação mecânica. Em estudos com pacientes em ventilação mecânica isolados de *Acinetobacter* foram obtidos em 15 a 25% dos indivíduos. <sup>(34;35)</sup> Este fato tem sido atribuído, provavelmente, às complicações proeminentes da ventilação mecânica associada ao crescente número de pacientes que a tem utilizado. Além disso, alguns fatores têm sido identificados como relevantes no aumento do risco de pneumonia ou colonização do trato respiratório inferior por *Acinetobacter* spp. como, idade avançada, doença pulmonar crônica, imunossupressão, cirurgia, uso de agentes antimicrobianos, presença de procedimentos invasivos, tais como tubos gástricos e endotraqueais e alguns tipos de equipamentos respiratórios. <sup>(36)</sup>

Segundo dados recentes do “National Nosocomial Infections Surveillance” (NNIS) a prevalência de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. pode estar aumentando, os dados do NNIS indicam que os episódios de pneumonia em unidades de tratamento intensivos, associada ao *Acinetobacter* spp. tem aumentado significativamente, o qual passou de 4% em 1986 para 7% em 2003 ( $p < 0,001$ ). <sup>(37)</sup>

No ambiente hospitalar as espécies de *Acinetobacter* tem sido obtidas nas fontes mais variadas, como em superfícies úmidas <sup>(38)</sup>, colchões <sup>(33)</sup>, travesseiros <sup>(39)</sup>, e também é

frequentemente encontrado em umidificadores, <sup>(40)</sup> mas seu principal modo de disseminação são as mãos dos profissionais. <sup>(41)</sup> Amostras de *Acinetobacter* spp. podem persistir no ambiente por vários dias sob condições úmidas ou secas mantendo-se viáveis por até 5 meses nos mais diversos materiais, facilitando assim sua transmissão. <sup>(8)</sup>

Cada vez mais esse microorganismo tem sido envolvido em processos infecciosos em todo o mundo. Na América Latina, segundo dados do programa SENTRY *Acinetobacter* spp. é o quarto agente mais freqüente em pneumonias. Surto de infecção causados por esse agente tem sido relatados em diferentes áreas hospitalares, como UTIs neonatais e ou de adultos, enfermarias clínicas, cirúrgicas e também em unidades de queimados. <sup>(6)</sup>

Um surto de *Acinetobacter* multirresistente foi relatado num estudo, o qual descreveu a disseminação clonal entre pacientes de um mesmo hospital e ainda entre diferentes hospitais de São Paulo. <sup>(42)</sup> Em outro estudo, foram encontrados clones multirresistentes de *Acinetobacter* spp., os quais estavam disseminados em diferentes hospitais no mesmo país. <sup>(7)</sup> Em 2003, foi reportado em Curitiba, Brasil, um surto de *Acinetobacter* spp., resistente aos carbapenêmicos, produtor da enzima OXA-23, provenientes de um clone único. <sup>(43;44)</sup>

A disseminação clonal revela a necessidade de utilização de medidas de bloqueio epidemiológico e lavagem de mãos, com intuito de diminuir a ocorrência de infecção cruzada de paciente para paciente de cepas multirresistentes.

### 2.3 Resistência aos Antimicrobianos

No começo dos anos setenta, infecções causadas por *Acinetobacter* spp. poderiam ser tratadas com antibiótico de espectro limitado como gentamicina, ácido nalidíxico, ampicilina ou carbenicilina. Porém, em meados da década de setenta, houve um aumento nas taxas de resistência e a maioria das amostras de *Acinetobacter* spp. tornaram-se resistentes a múltiplos antibióticos. <sup>(45;46)</sup>

Embora multirresistente, o gênero mantinha sensibilidade quase universal aos carbapenêmicos. Assim, na década de noventa, o imipenem era o único antimicrobiano efetivo no tratamento das infecções causadas pelo *Acinetobacter* spp., porém, no final dessa década já tinham sido relatados casos de resistência a esse antimicrobiano. <sup>(47;48)</sup>

No Brasil, assim como na América Latina, dados de estudos multicêntricos indicam que a maioria das amostras de *Acinetobacter* spp. são sensíveis somente aos carbapenêmicos, e aproximadamente 10 a 20% destes são resistentes a todos antimicrobianos. <sup>(7;49)</sup>

O principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos  $\beta$ -lactâmicos ocorre devido à produção de enzimas que catalisam a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico ( $\beta$ -lactamases). O grau de resistência dependerá da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que penetra pela membrana externa da bactéria. O gene que codifica a produção de  $\beta$ -lactamases pode estar localizado no DNA cromossômico ou no DNA extracromossômico (plasmídios ou transposons). Algumas  $\beta$ -lactamases usam como co-fatores enzimáticos íons zinco, enquanto que a maioria usa ésteres de serina. <sup>(50)</sup>

Em 1989, foi proposta uma classificação, por Bush, cujo agrupamento incluiu enzimas  $\beta$ -lactamases de todos os grupos bacterianos e que correlaciona substratos e propriedade de inibição, integrando características funcionais e moleculares. Quatro grupos foram definidos de acordo com o substrato e os perfis de inibição:

- *Grupo 1*:  $\beta$ -lactamases que não são inibidas pelo ácido clavulânico;
- *Grupo 2*:  $\beta$ -lactamases de amplo espectro, geralmente inibidas pela ação do ácido clavulânico;
- *Grupo 3*: metallo-beta-lactamases que atuam sobre penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos; não inibidas pelo ácido clavulânico e inibidas pelo EDTA;
- *Grupo 4*:  $\beta$ -lactamases que não inibidas pelo ácido clavulânico. <sup>(51)</sup>

Devido ao aparecimento crescente de  $\beta$ -lactamases e de sua diversidade (TEM-derivados e SHV-derivados), em 1995, o esquema de classificação desenvolvido por Bush sofreu modificações, proposta por Bush, Jacoby e Medeiros, a nova classificação deu origem a subgrupos, por exemplo, os subgrupos com o prefixo 2b, 2be, 2f etc., para melhor caracterizar as diferentes enzimas. Ambler, na década de oitenta, propôs uma classificação molecular, na qual a seqüência genética define quatro classes designadas como A, B, C e D. <sup>(52)</sup>

Em 2001, Bush adaptou sua classificação anterior às formas de aquisição dos genes que codificam  $\beta$ -lactamases, <sup>(53)</sup> conforme tabela 1.

**Tabela 1:** Características funcionais e moleculares dos principais grupos de  $\beta$ -lactamases.

Grupo funcional	Sub-grupos	Classe molecular	Características funcionais	N°estimado de enzimas	
				1995	2000
1		C	Enzimas frequentemente cromossomais em BGN, mas podem ser codificados por plasmídios. Conferem resistência a todos os $\beta$ -lactâmicos, exceto carbapenens (exceto). (quando combinado com alteração ferina). Não são inibidas por ácido clavulânico.	32	51
2		A e D	Grande maioria das enzimas é inibida por ácido clavulânico	136	256
	2a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp.. Conferem altos níveis de resistência às penicilinas	20	23
	2b	A	$\beta$ - lactamases de espectro reduzido de bactérias Gram negativas. Inclui TEM-1 e SHV-1	16	16
	2be	A	ESBL conferem resistência a cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	36	119
	2br	A	$\beta$ - lactamases derivadas da TEM resistentes ao inibidor de beta-lactamases (IRT)	9	24
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina	15	19
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina); pouco inibidas pelo ácido clavulânico	18	31
	2e	A	cefalosporinase inibidas por ácido clavulânico	19	20
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenens com sítio ativo serina, inibidas por ácido clavulânico	3	4
3	3a,3b,3c	B	Metallo- $\beta$ -lactamases que conferem resistência aos carbapenens e todos os outros $\beta$ -lactâmicos com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas por ácido clavulânico	13	24
4	ND		Enzimas não seqüenciadas que não se encaixam em outros grupos	7	9

*Adaptada do artigo de Bush, 2001.*

## 2.4 Principais $\beta$ -lactamases de importância clínica

### 2.4.1 $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL)

As ESBLs são enzimas mediadas por genes plasmidiais, capazes de hidrolisar a cadeia oximino-beta-lactâmica presente na estrutura química da droga, o que faz com que seu espectro de ação se estenda aos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, como as cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e monobactâmicos (aztreonam), mas não conferem resistência às cefamicinas (cefotaxima e cefotetan) e carbapenêmicos (imipenem e meropenem). Frequentemente, na mesma cepa podem existir muitos plasmídios e múltiplas ESBLs, e algumas co-resistências são carregadas dentro do mesmo plasmídio, como a resistência aos aminoglicosídeos, tetracilinas, sulfonamidas e fluoroquinolonas. <sup>(54)</sup>

As ESBLs da classe A de Ambler são em sua grande maioria derivadas das enzimas TEM-1 ou SHV-1. As enzimas descritas posteriormente, apresentando as mesmas características, foram incorporando diferentes números as suas nomenclaturas. Em *Acinetobacter* spp., já foram descritas enzimas do tipo TEM-1, TEM-2 e SHV-1. No entanto, um pequeno número de ESBL, as quais, não apresentam relação com nenhuma classe de ESBL estabelecida, tem sido relatadas. As  $\beta$ -lactamases do tipo PER-1 e VEB-1 são exemplos destas enzimas, as quais foram isoladas em *Acinetobacter* spp. <sup>(55-58)</sup>

A emergência dos microorganismos produtores de ESBL tem grande importância clínica, pois este mecanismo é mediado por plasmídios, facilitando sua transmissão horizontal. A presença de cepas produtoras de ESBL acarreta implicações terapêuticas, por que a extensão do espectro de resistência para cefalosporinas de terceira e quarta geração

impõe limites para a utilização de  $\beta$ -lactâmicos, podendo aumentar a prescrição de carbapenêmicos. <sup>(53)</sup>

### 2.4.2 Oxacilinases

No grupo 2 da classificação de Bush, Jacoby e Medeiros, (classe molecular D de Ambler), estão as oxacilinases. Estas enzimas utilizam como substrato a oxacilina, e são inibidas pelo ácido clavulânico, não dependendo de zinco como co-fator. <sup>(52)</sup> Algumas enzimas da família das oxacilinases possuem atividade hidrolítica contra os carbapenens, e são encontradas em *Acinetobacter* spp. <sup>(59)</sup>

As oxacilinases do *Acinetobacter* spp. , são divididas em 5 subgrupos filogenéticos: OXA-23 e OXA-27 (muito similares); OXA-24; OXA-51 e OXA-58. <sup>(60)</sup> Recentemente, foi sugerido que as enzimas do subgrupo OXA-51 são de produção intrínseca em *Acinetobacter* spp. <sup>(61)</sup> A detecção de OXA no laboratório é difícil com testes fenotípicos, e sua pesquisa só pode ser realizada através de técnicas moleculares. <sup>(43;44)</sup>

### 2.4.3 Metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs)

As classificadas no grupo 3 de Bush, Jacoby e Medeiros, classe molecular B de Ambler, <sup>(52)</sup> são normalmente cromossomais, mas também são encontradas em plasmídios. Possuem íons zinco em seu sítio e dependem dele para realização de sua atividade catalítica. Estas enzimas não são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, mas são inibidas por agentes quelantes como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou compostos derivados do ácido tiolático, como ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA). <sup>(62;63)</sup> As primeiras MBLs incluíam as classes IMP e VIM, as quais hidrolisam diversos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo ceftazidima e cefepima, mas não o aztreonam. No entanto, bactérias produtoras de

MBLs podem ser resistentes ao aztreonam por outros mecanismos. E, por serem capazes de hidrolisar também o imipenem e meropenem, são denominadas carbapenases. <sup>(64)</sup>

O primeiro relato de *Acinetobacter* spp. produtor de MBLs do tipo IMP no Brasil foi descrito por Gales *et al*, em 2003. <sup>(65)</sup> Embora as MBLs mais conhecidas e estudadas sejam IMP e a VIM, outros tipos já foram descritas (SPM, somente em *P. aeruginosa*, GIM e SIM). Entre estas novas MBLs a SIM foi descrita em *Acinetobacter* na Coreia sendo que os isolados apresentavam baixos níveis de resistência para imipenem e meropenem (8 e 16 µg/mL) e fenótipo multirresistente. <sup>(8;8;66-68)</sup>



## 2.5 Métodos de detecção $\beta$ -lactamases em *Acinetobacter* spp.

Na rotina dos laboratórios de microbiologia no Brasil, utiliza-se o teste de disco difusão para avaliar o perfil de susceptibilidade de *Acinetobacter* padronizado conforme o CLSI – (“Clinical and Laboratory Standards Institute”). No entanto, este teste pode não detectar a resistência mediada por  $\beta$ -lactamases. <sup>(69)</sup> Sendo assim, outros métodos fenotípicos tem sido propostos para detecção dessas enzimas.

Testes fenotípicos para detecção de  $\beta$ -lactamases em bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose são restritos, pois essas bactérias, e em particular, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., pode expressar simultaneamente vários mecanismos de resistência aos antimicrobianos, o que dificulta a interpretação do resultado dos testes fenotípicos. <sup>(62)</sup>

Assim, há uma diversidade de enzimas já relatadas em *Acinetobacter* spp. as quais apresentam diferentes respostas frente à ação dos inibidores de  $\beta$ -lactamases, dificultando a padronização do método no caso de ESBL. Estudos sugerem um teste de aproximação de discos para sua detecção que, apesar de não serem padronizados para *Acinetobacter* spp., tem sido muito utilizados para família *Enterobacteriaceae* (em especial *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli*). Este teste utiliza um disco contendo clavulanato, que deve ser colocado 2,0 cm disco a disco de  $\beta$ -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, cefepima ou aztreonam). Um aumento ou distorção no halo entre o clavulanato e algum dos  $\beta$ -lactâmicos, indica presença de ESBL. <sup>(58)</sup>

Por outro lado, a determinação da presença de MBLs pode ser feita através de um teste que utiliza substâncias que bloqueiam a ação das  $\beta$ -lactamases zinco dependentes. O método de aproximação de discos proposto por Arakawa *et al*, em 2002, consiste em verificar

a ação inibidora do ácido 2-MPA e/ou EDTA, sobre a enzima permitindo ação do substrato sobre a bactéria. O aparecimento de uma distorção entre os discos é considerado indicativo de produção de MBL. <sup>(62)</sup> Também pode ser utilizado o método de Etest® MBL que usa uma fita combinada de imipenem e imipenem associada ao EDTA. A razão na concentração inibitória mínima (MIC) do imipenem em relação à associação deve ser  $\geq 8$ , ou seja, redução  $\geq 3$  diluições na MIC do imipenem quando comparado a MIC deste antimicrobiano associado ao EDTA. <sup>(70)</sup>

Para detecção de outras  $\beta$ -lactamases (tipo OXA) não existem testes fenotípicos padronizados, e a confirmação da presença de MBL é realizada por técnicas moleculares como PCR com “primers” específicos ou por seqüenciamento dos genes amplificados. Estas técnicas são importantes para detecção dos genes responsáveis pela codificação das  $\beta$ -lactamases, porém, ainda com um custo muito elevado, o que dificulta seu uso em rotinas laboratoriais. <sup>(43;44)</sup>

## 2.6 Tipagem molecular de *Acinetobacter* spp.

Métodos de tipagem molecular são importantes recursos para determinar fontes e modo de transmissão de microrganismos. Testes fenotípicos, tais como biotipagem ou eletroforese de proteínas são usadas para caracterização de surtos, porém os testes fenotípicos para *Acinetobacter* spp. são pouco reprodutíveis e com pobre poder discriminatório, então, testes genotípicos tem sido usado para caracterizar isolados da maioria das pesquisas relatadas desde 1988.<sup>(10)</sup>

Muitos estudos tentam correlacionar diferentes métodos de tipagem, comparando biotipagem, teste de susceptibilidade, análise de proteínas, análise de plasmídios, “pulsed-field gel electrophoresis” – PFGE e a reação da polimerase em cadeia (PCR) com “primers” aleatórios. De acordo com muitos autores a biotipagem, análise de proteínas e de plasmídios tiveram menor poder discriminatório, entretanto, teste de susceptibilidade e PCR mostraram um moderado e a PFGE apresentou o melhor poder discriminatório entre os métodos.<sup>(9;11)</sup> (Tabela 2).

Portanto, um dos métodos mais utilizados para tipagem molecular utiliza a análise do perfil de macrorrestrição do DNA, seguido de eletroforese em campo pulsado. Assim, as moléculas de DNA são separadas de acordo com o seu tamanho em um gel de agarose submetido a uma corrente elétrica pulsada. E o perfil de migração obtido pode ser a “impressão digital” de uma determinada bactéria.<sup>(71)</sup>

Análise de bactérias multirresistentes através de técnicas moleculares de tipagem é essencial para uma investigação de surtos de infecção hospitalar. Caso os resultados da tipagem molecular mostrem que a maioria das amostras resistente apresenta o mesmo perfil,

teremos um mesmo clone se disseminando, portanto, medidas de barreira adequadas devem ser adotadas para que o patógeno em questão não seja transmitido de paciente-paciente ou paciente-profissional de saúde.

Se os resultados da tipagem mostrarem que há uma grande variedade genética entre as amostras que apresentam um mesmo tipo de resistência indicam que o problema provavelmente seja decorrente de seleção independente de mutantes resistentes. Neste caso, medidas que alterem o uso de antimicrobianos na instituição deverão ser tomadas. <sup>(71;72)</sup>

**Tabela 2:** Comparação entre métodos e principais resultados de tipagem molecular de diversos estudos epidemiológicos de *Acinetobacter* spp.

Origem do trabalho/ano	Genes e enzimas pesquisadas	Métodos de tipagem	Principais resultados	Referência
Alemanha (1995)	-	Ribotipagem e PFGE	Maior poder discriminatório do PFGE	Seifert <i>et al</i> <sup>(73)</sup>
Brasil (1996)	-	PFGE	Transmissão entre hospitalais	Sader <i>et al</i> <sup>(49)</sup>
China (1997)	-	4 tipos de PCRs e PFGE	Maior poder discriminatório do PFGE	Liu and Wu <sup>(74)</sup>
Espanha (2000)	-	REP-PCR, AP-PCR e PFGE	Múltiplos clones; REP-PCR maior poder discriminatório que AP-PCR comparado ao PFGE	Bou <i>et al</i> , <sup>(75)</sup>
Coréia (2002)	MBL, gene <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	PFGE	Disseminação clonal	Yum <i>et al</i> <sup>(67)</sup>
França (2003)	ESBL, gene <i>bla</i> <sub>VEB-1</sub>	PFGE	Surto clonal	Poirel <i>et al</i> <sup>(55)</sup>
Brasil (2003)	Enzima OXA-23	PFGE	Surto clonal	Dalla-Costa <i>et al</i> <sup>(43)</sup>
Coréia (2003)	ESBL, gene <i>bla</i> <sub>PER-1</sub>	PFGE	Múltiplos clones	Yong <i>et al</i> <sup>(56)</sup>
China (2004)	-	PFGE	Surto clonal	Yun-Song <i>et al</i> <sup>(76)</sup>
Japão (2004)	ESBL, CTX-M-2	Ribotipagem	Disseminação clonal	Nagano <i>et al</i> <sup>(77)</sup>
Filadélfia (2005)	-	PFGE	Clone predominante	Maslow <i>et al</i> <sup>(78)</sup>
Israel (2005)	-	PFGE	Múltiplos clones	Abbo <i>et al</i> <sup>(79)</sup>
Coréia (2005)	MBL, gene <i>bla</i> <sub>SIM-1</sub>	PFGE	Duas linhagens clonais diferentes	Lee <i>et al</i> <sup>(66)</sup>
Coréia (2006)	ESBL, gene <i>bla</i> <sub>PER-1</sub>	PFGE	Surto clonal	Jeong <i>et al</i> <sup>(58)</sup>
Bélgica (2006)	ESBL, gene <i>bla</i> <sub>PER-1 e VEB-1</sub>	PFGE	Clones relacionados entre cidades européias	Nass <i>et al</i> <sup>(57)</sup>
França (2006)	-	PFGE	Múltiplos clones	Fillaux <i>et al</i> <sup>(80)</sup>
Brasil (2006)	MBL, gene <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	Ribotipagem	Presença de dois ribogrupos	Tognim <i>et al</i> <sup>(81)</sup>

### 3. OBJETIVOS

1. Avaliar o perfil de susceptibilidade do *Acinetobacter* spp. aos antibióticos nas diferentes unidades clínicas do Hospital São Lucas da PUCRS;
2. Pesquisar a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL) e metalo- $\beta$ -lactamases (MBL) em *Acinetobacter* spp.;
3. Determinar a relação clonal entre as amostras de *Acinetobacter* spp.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

- (1) Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features. J Microbiol Rev 1996;9:148-65.
- (2) Jones RN, Sader HS, Beach ML. Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). Int J Antimicrob Agents 2003;22(6):551-6.
- (3) Schreckenberger PC, Von Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium* and other non-fermentative Gram-negative rods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8 ed. Washington: American Society for Microbiology; 2003. p. 539-60.
- (4) Cisneros JM, Rodríguez-Bano J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. Clin Microbiol Infect 2002;8:687-93.

- (5) Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin Infect Dis 2006;42:692-9.
- (6) Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. Braz J Infect Dis 2004;8(1):25-79.
- (7) Tognim MCB, Andrade SS, Silbert S, Gales AC, Jones RN, Sader S. Resistance trends of *Acinetobacter* spp in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Int J Infect Dis 2004;8:284-91.
- (8) Kramer A, Schwwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infect Dis 2006;16:6-130.
- (9) Marcos MA, Jimenes MT, Vila J. Correlation of six methods for typing nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Med Microbiol 1995;42(5):328-35.
- (10) Villegas M, Hartstein A. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. Infect Control Hosp Epidemiol 2003;284-95.
- (11) Seifert H, Schulze A, Baginski R, Pulverer G. Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 1994;32:1816-9.
- (12) Baumann P, Doudoroff M, Stanler RY. A study of the *Moraxella* grup. II. Oxidase-negative species(genus *Acinetobacter*). J Bacteriol 1968;95:1520-41.



- (13) Warskow AL, Juni E. Nutricional requirements of *Acinetobacter* strains isolated from soil, water and sewage. J Bacteriol 1972;112:1014-6.
- (14) Baumann P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. J Bacteriol 1968;96:39-42.
- (15) Bouvet PJ, Grimont PAD. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter* sp. nov., *Acinetobacter haemoliticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions as *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. J Syst Bacteriol 1986;36:228-40.
- (16) Enright MC, Carter PE, MacLean IA, MacKenzie H. Phylogenetic relationships between some members of the genera *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Moraxella* and *Kingella* based on partial 16S ribosomal DNA sequence analysis. J Syst Bacteriol 1994;44:387-91.
- (17) Pettersson B, Kodjo A, Ronaghi M, Uhlen M, Tonjum T. Phylogeny of the family *Moraxellaceae* by 16S rDNA sequence analysis, whit special emphasis on differentiation of *Moraxella* species. J Syst Bacteriol 1998;48:75-89.
- (18) Bouvet PJM, Jeanjean S, Vieu JF. Species, biotype, and bacteriophage type determinations compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. J Clin Microbiol 1990;28:170-6.
- (19) Tjenberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. APMIS 1989;97:595-605.

- (20) Ehrenstein B, Bernards AT, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner KJ, Bouvet PJ. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. J Clin Microbiol 1996;34:2414-20.
- (21) Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. 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 2005;43(4):1632-9.
- (22) La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the rpoB gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol 2006;44(3):827-32.
- (23) Misbah S, Hassan H, Yusof MY, Hanifah YA, AbuBakar S. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. Singapore Med 2005;46(9):461-4.
- (24) Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahn D. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. Antimicrob Agents Chemother 2003;47(5):1681-8.
- (25) Zeana C, Larson E, Sahni J, Bayuga SJ, Wu F, Della-Latta P. The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: does the community represent a reservoir? Infect Control Hosp Epidemiol 2003;24:275-9.

- (26) Somerville DA, Noble WC. A note on the gram-negative bacilli of human skin. *Eur J Clin Biol Res* 1970;40:669-70.
- (27) Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechouttes M. Distribution of *Acinetobacter* Species on Human Skin: Comparison of Phenotypic and Genotypic Identification Methods. *J Clin Microbiol* 1997;35:2819-25.
- (28) Rosenthal SL. Sources of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species found in human culture materials. *Am J Clin Pathol* 1974;62:807-11.
- (29) Blot S, Vandewoude K, Colardyn F. Nosocomial bacteremia involving *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: a matched cohort study. *Int Care Med* 2003;29:471-5.
- (30) Hoffmann S, Mabeck CE, Vejlsgaard D. Bacteriuria caused by *Acinetobacter calcoaceticus* biovars in a normal population and in general practice. *J Clin Microbiol* 1982;16:443-51.
- (31) Gradon DJ, Chapnick EK, Lutwick LI. Infective endocarditis due to *Acinetobacter*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1992;14:1445-148.
- (32) Berk SL, McCabe WR. Meningitis caused by *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitratus*: a specific hazard in neurosurgical patients. *Arch Neurol* 1981;38:95-8.
- (33) Sherertz RJ, Sullivan ML. An outbreak of infections with *Acinetobacter calcoaceticus* in burn patients: contamination of patients' mattresses. *J Infect Dis* 2006;151:252-8.

(34) Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL, Pierre J, Darne C, et al. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. *Am Ver Respir Dis* 1989;139:877-44.

(35) Cefai C, Richards J, Gould FK, McPeake P. An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilatory equipment. *J Hosp Infect* 1990;15:177-82.

(36) Lortholary O, Fagon JY, Bu Hoi A, Slama MA, PJ, Giral P, et al. Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* 1995;20:790-6.

(37) Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 2005;41:848-54.

(38) Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rudeni H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997;35:1394-7.

(39) Weernink A, Severin WPJ, Tjernberg I, Dijkshoorn L. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J Hosp Infect* 1995;29:189-99.

(40) Gervich DH, Grout CS. An outbreak of nosocomial *Acinetobacter* infections from humidifiers. *Am J Infect Control* 1985;13:210-5.

- (41) Musa EK, Desai N, Casewell MW. The survival of *Acinetobacter calcoaceticus* inoculated in fingertips and on formic. *J Hosp Infect* 1990;15:219-27.
- (42) Sader HS, Mendes CF Pignatari AC, Pfaller MA. Use of macrorestriction analysis to demonstrate interhospital spread of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in São Paulo, Brazil. *Clin Infect Dis* 1996;23:631-4.
- (43) Dalla -Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003;41:3403-6.
- (44) Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrobial Agents* 2006;27:351-3.
- (45) Garcia I, Fainstein V, Leblanc B, Bodey P. In vitro activities of new beta-lactam antibiotics against *Acinetobacter* spp. *Agents Chemother* 1983;24:297-9.
- (46) Obana M, Nishino T, Tanino T. *In vitro* and *in vivo* activities of antimicrobial agents against *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 1985;15:441-8.
- (47) Go SE, Urba C, Burns J, Kreiswirth, Eisner W, Mariano N. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections susceptibility only to polymixin B and sulbactam. *Lancet* 1994;344:1329-32.

- (48) Tankovic J, Legrand P, De Gatines G, Chemeneau V, Brun-Buisson C, Duval J. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic methods. Clin Microbiol 1994;32:2677-81.
- (49) Sader HS. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. Braz J Infect Dis 2000;4:91-9.
- (50) Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. Scand J Infect Dis Suppl 1991;78:7-16.
- (51) Bush K. Characterization of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1989;33:259-63.
- (52) Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1211-33.
- (53) Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001;32:1085-9.
- (54) Rossi F, Andreazzi DB. Antibióticos e Resistência Bacteriana. Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma. 1 ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 21-6.
- (55) Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordemann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in French hospital. J Clin Microbiol 2003;41:3542-7.

- (56) Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K. Height prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1749-51.
- (57) Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupezynski, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2006;1-5.
- (58) Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Yong D, Woo GJ, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a intensive care unit. *J Hosp Infect* 2005;59:242-8.
- (59) Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997.
- (60) Brown S, Amyes S. OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:1-3.
- (61) Héritier C, Poirel L, Pierre-Edouard F, Jean-Michel C, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacilinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4174-9.
- (62) Arakawa Y, Shibata N, Shibayana K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000;38:40-3.

- (63) Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2002;40:3798-801.
- (64) Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, et al. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1612-5.
- (65) Gales AC, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. Diagn Microbiol Infect Dis 2003;45:77-9.
- (66) Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Jean-Denis D, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla SIM-1, in class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4485-91.
- (67) Yum JH, Hyukmin L, Yong D, Lee K, Kim JM, Rossolini GM, et al. Molecular characterization of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the bla VIM-2 gene cassettes. J Antimicrob Chemother 2002;49:837-40.
- (68) Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- $\beta$ -Lactamases: The quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005;306-26.



(69) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eighth Informational Supplement. Approved standards M100-S8 . 2006. Villanova, Pa.

(70) Jing-Jou Y, Jiunn-Jong W, Shu-Huei T, Chin-Luan C. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;49:5-11.

(71) 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 strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.

(72) Pfaller MA. Molecular Epidemiology in the care of patient. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:1007-10.

(73) Seifert H, Gerner-Smidt P. Comparison of rib typing and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol* 1995;33:1402-6.

(74) Liu PY, Wu WL. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate of *Acinetobacter baumannii* complex. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;29(1):19-28.

(75) Bou G, Cervero G, Domingues MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed field electrophoresis characterization of a

nosocomial outbreak caused by imipenem and Meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2000;6(12):635-43.

(76) Yun-Song Y, Yang O, Xiao-Wei X, Hai-Shen K, Gen-Yun X, Bu-Yun Z. Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in a Chinese hospital. J Med Microbiol 2004;53:653-6.

(77) Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y. Nosocomial transmission of CTX-M-2  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. J Clin Microbiol 2004;42:3978-84.

(78) Maslow JN, Galze T, Adams P, Lataillade M. Concurrent outbreak of multidrug-resistant and susceptible subclones of *Acinetobacter baumannii* affecting different wards of a single hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2005;26:69-75.

(79) Abbo A, Venezia SN, Muntz OH, Yardena SI, Carmell Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Emerg Infect Dis 2005;11:22-9.

(80) Fillaux J, Dubouix A, Conil JM, Laguerre J, Marty N. Retrospective analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated during a 4-year period in a University Hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2006;27:647-53.

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

**Stable imipenem susceptibility rates among multidrug-resistant  
*Acinetobacter* species isolates in a Brazilian teaching hospital**

Fabiana da Silva Corrêa Soares\*, Alexandre Prehn Zavascki\*\* and Afonso Luís Barth\*\*\*

\* *Microbiology Unit, Clinical Pathology Service, São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

\*\* *Infectious Diseases Service, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

\*\*\* *Microbiology and Molecular Biology Unit, Clinical Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil*

Corresponding author: Fabiana da Silva Corrêa Soares, Mail address: Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Unidade de Microbiologia. 6690 Ipiranga Avenue. Zip code: 90610-000. Porto Alegre – RS. Brazil.  
Tel/Fax number: (+51)33203000. E-mail address: fabycs@bol.com.br

## SUMMARY

We described stable rates of carbapenem susceptibility among endemic multi-drug resistant (MDR) clones of *Acinetobacter* spp. in a tertiary-care hospital with high rates of carbapenem-resistance among *Pseudomonas aeruginosa*.

## INTRODUCTION

*Acinetobacter* spp. has emerged as an important nosocomial pathogen in many parts of the world. <sup>(1)</sup> This organism is associated with a wide range of serious infections, particularly pneumonia among intensive care unit (ICU) patients. <sup>(1)</sup> Infections are often difficult to treat as a result of a high-level resistance to many antibiotics. <sup>(1,2)</sup> The carbapenems, imipenem and meropenem, are among the drugs of choice to treat nosocomial infections due to multidrug-resistant *A. baumannii* isolates. <sup>(3)</sup> Carbapenem resistance in this species has been increasingly observed worldwide, drastically limiting the range of therapeutic alternatives. <sup>(1,2,3)</sup>

At our institution (“Hospital São Lucas” - HSL), a tertiary-care teaching hospital in southern Brazil, high rates of carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* have been reported. <sup>(4)</sup> Most of this resistance was mediated by metallo- $\beta$ -lactamases. <sup>(4)</sup> Since the emergence of resistance to *P. aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* have been strongly associated with antibiotic use, <sup>(5)</sup> and both pathogens present similar epidemiological features in the hospital setting, <sup>(1,2)</sup> it might be expected that considerable rates of resistance to carbapenems would also be found among *Acinetobacter* spp. isolates. In this report, we aimed

to describe surprisingly stable rates of carbapenem resistance among endemic multi-drug resistant (MDR) isolates of *Acinetobacter* spp. in HSL.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study design**

The study was conducted at a 600-bed tertiary-care teaching hospital in Porto Alegre, southern Brazil. The hospital has a 13-bed adult general ICU, two (15 and 7-bed) adult cardiac ICU, a 12-bed paediatric ICU and a 38-bed neonatal ICU. The study was separated in two distinct periods: period 1, from January 2002 to December 2003; and period 2, from January 2005 to June 2006. All *Acinetobacter* spp. isolates recovered from hospitalised patients (one isolate per patient) during these periods were included. The following variables were analysed: period, year, patient location, site of infection/colonisation, and susceptibility profile.

### **Characterisation of isolates and antimicrobial susceptibility testing**

Biochemical tests were used to identify *Acinetobacter* spp. which included: Gram stain morphology, ability to ferment carbohydrates, motility, oxidase and catalase activity and oxidation of glucose in OF-medium; the Vitek System (bioMèrieux, Hazelwood,MO) was used to identify to species level. The susceptibility rates of the isolates were determined by the disk diffusion method on Mueller-Hinton (MH) agar plates and following antibiotics were tested: amikacin, ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin, aztreonam, imipenem and sulbactam/ampicilin. Meropenem was also tested in isolates recovered in 2005 and 2006. The results of antimicrobial susceptibility tests were interpreted according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>(6)</sup>

## **Molecular typing**

Twenty-seven randomly selected isolates of *A. baumannii/calcoaceticus* complex were submitted to molecular typing by DNA macrorestriction using *Sma*I followed by PFGE as previously described. <sup>(7)</sup> Restriction fragment profiles were compared visually and interpreted according to the criteria of Tenover *et al.* <sup>(8)</sup>

## **Statistical analysis**

Statistical analysis was carried out using SPSS for Windows, Version 10.0. Bivariate analysis was performed for each variable. *P* values were calculated by Chi-square test. A *P* value <0.05 was considered to be significant.

## **RESULTS**

A total of 844 *Acinetobacter* spp. isolates were included in the study. Five-hundred forty-two (64.2%) isolates were recovered from the first period and 302 (35.8%) from the second period. *Acinetobacter* spp. isolates were more frequently recovered from respiratory secretions (348 isolates, 41.2%), followed by blood (166, 19.7%), urine (132, 15.6%), central venous catheter tip (90, 10.7%), surgical wound (55, 6.5%), and other secretions (53, 6.3%).

The higher susceptibility rate was noted for imipenem (843 isolates, 99.9%). The single isolate resistant to imipenem was recovered in March 2006. The susceptibility rates to the other antimicrobials were as follows: sulbactam/ampicillin (82.7%), amikacin (23.5%), cefepime (19.2%), ciprofloxacin (18.6%), ceftazidime (18.0%), and aztreonam (7.3%). Meropenem was tested for 174 isolates and, with the exception of the isolate resistant to

imipenem, all were susceptible. This latter isolate were excluded from further analysis. Susceptibility only to imipenem, sulbactam/ampicillin were founded in 501 (59.4%) isolates, susceptibility to imipenem and sulbactam/ampicillin in 142 (16.8%), and susceptibility to three or more drugs in 200 (23.7%). Isolates susceptible only to imipenem or to imipenem and sulbactam/ampicillin were defined as Multi-Drug Resistant - MDR (643 isolates, 76.3%). The mean prevalence of MDR isolates by month was  $76.2\% \pm 14.1$ , ranging from 30.0% in November 2002 to 100% in October 2005. MDR isolates were significantly more frequent in the second period of the study (81.7% versus 73.2%, prevalence rate [PR] 1.12, 95% CI 1.08–1.20,  $P = 0.007$ ). The lowest prevalence of MDR isolates was observed in paediatric wards (46.4%) and the highest in cardiac ICUs (85.6%) and general ICU (83.5%),  $P < 0.001$ . Isolates recovered from blood cultures presented the lowest rates of MDR profile (63.6%) while surgical wound isolates (85.4%) presented the highest rates of this profile ( $P < 0.001$ ). The MDR profile was also presented in 80.5% of isolates recovered from respiratory secretions, 77.3% of those from urine, 72.2% of those from central venous catheter, and 83.0% of those from other secretions.

Twenty-seven isolates with the MDR profile were identified to species level (*A.baumannii/calcoaceticus* complex) and submitted to molecular typing (Table 1), one of them was the isolate resistant to the carbapenems. Five distinct clones were detected among these isolates: a major clone A (17 isolates, 63.0%) with 5 subtypes (A1, 8 isolates; A2, 4; A3, 1; A4, 3; and A5, 1); clone B (6, 22.2%), clone C (2, 7.4%), clone D (1, 3.7%) and clone E (1, 3.7%), figure 1. These isolates were recovered from blood (13 isolates, 41.1%), respiratory secretions (7, 25.9%), catheter tip (3, 11.1%), surgical wound (3, 11.1%) and other secretions (1, 3.7%). There was no statistical difference according to the specimen site among the clones ( $P = 0.80$ ). The 95% CI estimated prevalence of each clone in the entire population of *A.baumannii/calcoaceticus* complex isolates of our study are 42.4 to 80.6% for clone A, 8.6

to 42.3% for clone B, 0.9 to 24.3% for clone C, 0.1 to 19.0% for clone D, and 0.1 to 19.0% for clone E.

## DISCUSSION

Our study showed that there is a very high susceptibility rate of *Acinetobacter* spp. to carbapenems in our institution despite its relatively high rates of resistance to other antimicrobials. In fact, MDR *Acinetobacter* spp. reached the general rate of almost 80%, mostly in ICUs, and significantly increased over the period studied.

We were able to establish the presence of five MDR strains among the *A.baumannii/calcoaceticus* complex isolates although only a small number of isolates of this species (27) was submitted to molecular typing, a major clone (clone A) and its subtypes comprised most of MDR isolates (63.0%, 95% CI 42.4 to 80.6%), and it seems to be endemic at our institution. The second major clone (clone B) was firstly identified among carbapenem-susceptible isolates recovered in 2005. However, this clone was also further recovered in 2006 and, most importantly, the first carbapenem-resistant isolate emerged from an isolate from this clone. These findings are in accordance with many studies on molecular epidemiology of *Acinetobacter* spp. which shown that most endemic infections are caused by unique strains, usually arising from a common source or cross-transmitted between patients. <sup>(9)</sup>

Virtually no carbapenem resistance was observed over a period of more than 4 years of follow-up despite the extremely high rates of resistance to this class of drugs among *P. aeruginosa* isolates over a similar period of this survey, as indicated by other studies from our institution. <sup>(4,10,11)</sup> This class of antibiotics, therefore, remain as the drugs of choice to treat severe infections due to this organism at our institution, while the sulbactam/ampicillin may be an alternative, since 82.7% of the isolates were susceptible to this drug. Although the



isolates from 2004 were not actively surveyed, no carbapenem-resistant isolate was recovered during this period.

The selective pressure imposed by antibiotic usage has been strongly associated with the emergence of antimicrobial resistance. <sup>(2,3,5)</sup> However, the data of this and other studies in our institution suggest that, at least for carbapenems, the antibiotic use has only a relative role on the emergence of resistance among nonfermentative organisms in the hospital setting. Our results indicate that other factors also importantly mediate the dynamics of antimicrobial resistance epidemiology of these pathogens in nosocomial setting.

One of these factors is the intrinsically ability of the organism to develop resistance in an adverse environment. However, this may not explain the case of *Acinetobacter* spp., since its capacity to become resistant to many antimicrobial agents, including, carbapenems, is comparable to *P. aeruginosa*. <sup>(2,3)</sup> The fitness cost imposed by the development of antimicrobial resistance also determines the epidemiological success of a resistant organism. <sup>(12)</sup> In the same way, carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. have been reported with increasing frequency, <sup>(1)</sup> either endemic or epidemically, suggesting that resistant-isolates are as competitive as susceptible ones as a general rule, although some fitness advantage among specific susceptible strains from our hospital can not be discharged. Despite the small number of isolates analysed, clone B isolates predominated in the first months of 2006, and it is possible that such strain have distinct competitive fitness which would contribute to its prevalence and further spread of isolates with carbapenem-resistant phenotype.

In summary, our study gives rise to many insights about microbiological and epidemiological factors which can determine antimicrobial resistance in the nosocomial setting, and suggests that the epidemiology of antibiotic resistance profiles, at least among nonfermentative Gram-negative rods, is not only driven by antimicrobial consumption.

## **Acknowledgments**

We are grateful to of “Unidade de Microbiologia- Serviço de Patologia do HSL” for their help to collect the *Acinetobacter* isolates. We thank in special Daniela, Taísa and Juliana for their help. This study (03-172) received financial support from “Fundo de Incêntivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) - Hospital de Clínicas de Porto Alegre”.

## REFERENCES

- (1) Paterson DL. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis* 2006; 43 (Suppl 2): 43–48.
- (2) Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006; 43 (Suppl 2): 49–56.
- (3) Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol and Infect* 2006; 12: 826–836.
- (4) Zavascki AP, et al. High prevalence of metallo-beta-lactamase-mediated resistance challenging antimicrobial therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital. *Epidemiol and Infect* 2006. Published online: 7 July 2006; doi: 10.1017/S0950268806006893.
- (5) Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *J Hosp Infect* 2006; 64: 7–15.

- (6) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eighth Informational Supplement [Approved standards M100-S8.]. Villanova, PA: CLSI, 2006.
- (7) Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods in Molecular Medicine* 1998; 15:17–31.
- (8) Tenover FC, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233–2239.
- (9) Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infection Control and Hosp Epidemiol* 2003; 24: 284–295.
- (10) Zavascki AP, Cruz RP, Goldani LZ. High rate of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary-care teaching hospital in southern Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 805–807.
- (11) Zavascki AP, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 1148–1151.
- (12) Maisnier-Patin S, Andersson DI. Adaptation to the deleterious effects of antimicrobial drug resistance mutations by compensatory evolution. *Research in Microbiol* 2004; 155: 360–369.

**Table 1.** DNA macrorestriction profile, date of isolation, and susceptibility of the 27 *A. baumannii/calcoaceticus* isolates submitted to molecular typing.

DNA macrorestriction profile (n = 27)	Year*				Susceptibility	
	2002	2003	2005	2006	IMP	IMP, AMS
A1 (n = 8)	2	1	4	1	8	0
A2 (n = 4)	2	2	0	0	2	2
A3 (n = 1)	0	0	1	0	0	1
A4 (n = 3)	0	0	2	1	3	0
A5 (n = 1)	0	0	1	0	1	0
B (n = 6) †	0	0	3	3	1	4
C (n = 2)	0	0	2	0	2	0
D (n = 1)	0	0	1	0	1	0
E (n = 1)	0	0	1	0	0	1

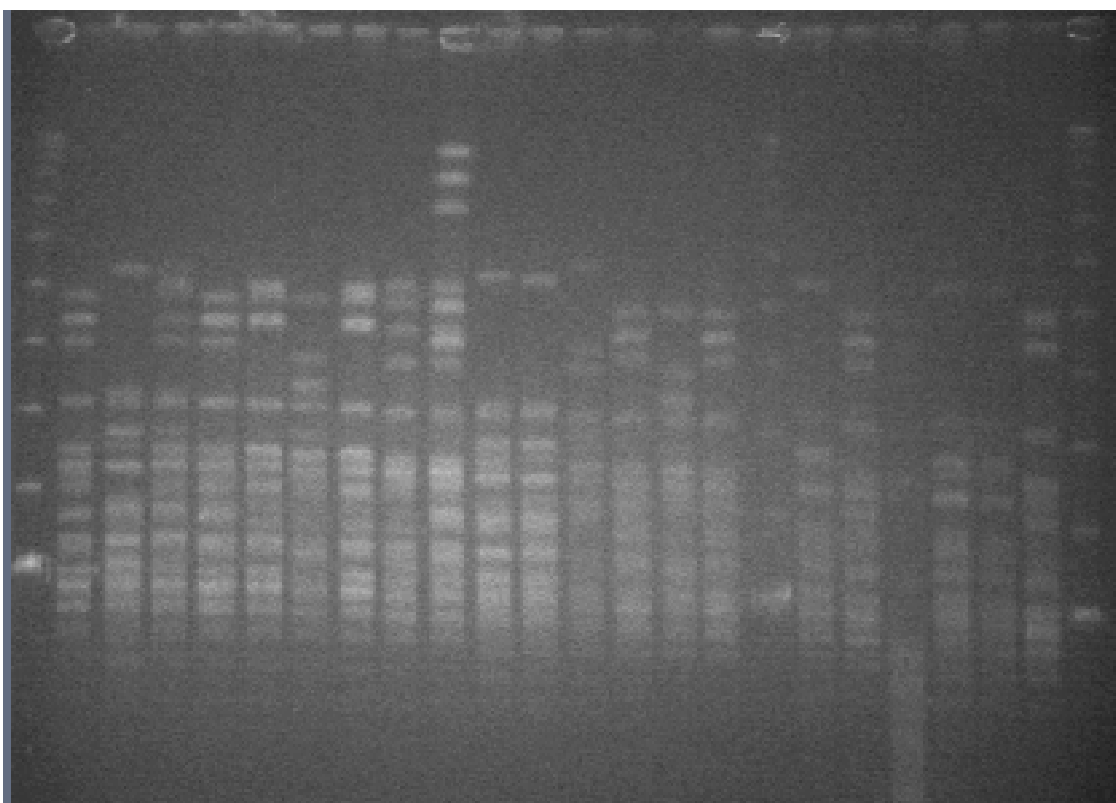
IMP, imipenem; AMS, ampicillin/sulbactam.

\*There was no statistically significant difference among the distinct clones along the years (P = 0.50).

† One isolate was resistant to all drugs, including carbapenems.

**Figure 1.** Macrorestriction profile of MDR *A. baumannii*/calcoaceticus complex from Hospital São Lucas.

$\lambda$  1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15  $\lambda$  16 17 18 19 20 21  $\lambda$



Lines 1,3,4,5,7,8,13,15,17 and 21: clone A and its subclones; Lines 2,10,11,16,19,20:clone B; Lines 6,14:clone C; Line 9:clone D; Line 12 clone E; Line 18: no typing ;  $\lambda$ : molecular weight marker

**Taxas de susceptibilidade estáveis aos carbapenêmicos entre isolados de *Acinetobacter* spp. multirresistentes num hospital universitário brasileiro**

Fabiana da Silva Corrêa Soares\*, Alexandre Prehn Zavascki\*\* and Afonso Luís Barth\*\*\*

*\*Unidade de Microbiologia, Serviço de Patologia Clínica, São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil*

*\*\*Serviço de Doenças Infecciosas, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil*

*\*\*\*Unidade de Microbiologia, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil*

\* Autor para correspondência: Fabiana da Silva Corrêa Soares, Endereço: Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Unidade de Microbiologia, Avenida Ipiranga 6690. CEP: 90610-000. Porto Alegre – RS. Brasil. Número tel/fax: (+51)33203000. Endereço eletrônico: [fabycs@bol.com.br](mailto:fabycs@bol.com.br)

## RESUMO

Nós descrevemos taxas estáveis de susceptibilidade aos carbapenêmicos entre clones endêmicos multirresistentes (MDR) de *Acinetobacter* spp. num hospital de cuidados terciários com taxas elevadas de resistência aos carbapenêmicos entre *Pseudomonas aeruginosa*.

## INTRODUÇÃO

*Acinetobacter* spp. emergiu como um patógeno nosocomial importante em muitas partes do mundo. <sup>(1)</sup> Este organismo está associado a diversas infecções, particularmente pneumonia entre pacientes de unidades de terapia intensiva. <sup>(1)</sup> As infecções são frequentemente difíceis de tratar em consequência de altos níveis de resistência a muitos antibióticos. <sup>(1,2)</sup> Os carbapenêmicos, imipenem e meropenem, estão entre as drogas de escolha usadas para tratar as infecções nosocomiais causadas por isolados *A. baumannii* multirresistentes. <sup>(3)</sup> A resistência aos carbapenêmicos nesta espécie tem sido observada cada vez mais em todo mundo, limitando drasticamente as alternativas de terapia. <sup>(1,2,3)</sup>

Em nossa instituição (“Hospital São Lucas”-HSL), um hospital universitário de cuidados terciários no sul do Brasil, taxas elevadas de resistência entre *Pseudomonas aeruginosa* tem sido relatadas. <sup>(4)</sup> A maioria destas resistências foi mediada por metallo-beta-lactamases. <sup>(4)</sup> Desde o surgimento da resistência a *P. aeruginosa* e *A. baumannii* tem sido fortemente associada com o uso de antibióticos, <sup>(5)</sup> e ambos patógenos tem características epidemiológicas semelhantes neste hospital, <sup>(1,2)</sup> poderia ser esperado que a taxas consideráveis de resistência aos carbapenêmicos seriam também encontradas entre isolados de



*Acinetobacter* spp. Neste relato, nosso objetivo foi descrever taxas surpreendentemente estáveis de resistência aos carbapenêmicos entre isolados endêmicos multirresistentes de *Acinetobacter* spp.

## **MÉTODOS**

### **Desenho do estudo**

O estudo foi realizado num hospital terciário com 600 leitos em Porto Alegre, sul do Brasil. O hospital tem uma unidade de tratamento intensiva adulta (UTI), com 13 leitos, duas cardíacas com 15 e 7 leitos (UTC), uma pediátrica com 12 leitos e uma neonatal com 38 leitos. O estudo foi dividido em dois períodos distintos: período 1, de Janeiro 2002 a Dezembro de 2003; e período 2, de Janeiro de 2005 a Junho de 2006. Todos isolados recuperados de *Acinetobacter* spp. de pacientes internados (um isolado por paciente), durante esse período foram incluídos. Foram analisadas as seguintes variáveis: período, ano, localização do paciente, sítio da infecção/colonização e perfil de susceptibilidade.

### **Caracterização dos isolados e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos**

Testes bioquímicos foram utilizados para identificação de *Acinetobacter* spp. incluíram: morfologia no Gram, habilidade de fermentar carboidratos, mobilidade, atividade da oxidase e catalase, oxidação de glicose no meio OF; também foi utilizado o sistema Vitek (bioMérieux, Hazelwood,MO) na identificação da espécie. As taxas de susceptibilidade dos isolados foi determinada pelo método disco-difusão em agar Mueller-Hinton (MH), contendo os seguintes antibióticos: amicacina, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacina, aztreonam, imipenem e ampicilina/sulbactam. Meropenem também foi testado nos isolados recuperados

em 2005 e 2006. Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram interpretados de acordo com o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).<sup>(6)</sup>

### **Tipagem molecular**

Foram selecionados randomicamente, vinte e sete isolados do Complexo *A. baumannii/calcoaceticus*, os quais foram submetidos à tipagem molecular através da macrorestrição do DNA, usando enzima de restrição *SmaI* seguido de eletroforese pulsada (PFGE) como descrito anteriormente.<sup>(7)</sup> Os fragmentos da restrição foram comparados visualmente segundo critérios de Tenover et al.<sup>(8)</sup>

### **Análise estatística**

Análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS para Windows, versão 10,0. Foi realizada análise bivariada para cada variável. Valores de *p* foram calculados pelo teste Qui-quadrado. Um valor de *p* <0,05 foi considerado significativo.

## **RESULTADOS**

Um total de 844 isolados de *Acinetobacter* spp. foram incluídos neste estudo. Quinhentos e quarenta e dois (64,2%) dos isolados foram recuperados no primeiro período e trezentos e dois (35,8%) no segundo período. *Acinetobacter* spp. foi mais frequentemente isolado de secreções respiratórias (348 isolados, 41,2%), seguido de sangue (166, 19,7%), urina (132, 15,6%), ponta de cateter venoso central (90, 10,7%), feridas cirúrgicas (55, 6,5%), e outras secreções (53, 6,3%).

A maior taxa de sensibilidade foi notada para imipenem (843 isolados, 99,9%). Apenas um único isolado resistente ao imipenem foi recuperado em março de 2006. Outras

taxas de sensibilidade foram como a seguir: ampicilina/sulbactam (82·7%), amicacina (23·5%), cefepime (19·2%), ciprofloxacina (18·6%), ceftazidima (18·0%), e aztreonam (7·3%). Meropenem foi testado em 174 isolados e, com exceção do isolado resistente ao imipenem, todos foram sensíveis. Este último isolado foi excluído na análise. Susceptíveis apenas ao imipenem foram encontrados em 501(59·4%) isolados, sensíveis ao imipenem e ampicilina/sulbactam em 142 (16·8%), e sensíveis a três ou mais drogas em 200 (23·7%). Isolados sensíveis apenas ao imipenem ou imipenem e ampicilina/sulbactam foram definidos como MDR, foram 643 isolados, 76,3%. A média de prevalência de MDR em cada mês foi  $76,2\% \pm 14,1$ , variando de 30,0% em Novembro 2002 a 100% em Outubro de 2005. Isolados MDR foram significativamente mais freqüentes no segundo período do estudo (81·7% versus 73·2%, taxa de prevalência [PR] 1·12, 95% CI 1·08–1·20,  $P = 0·007$ ). A menor prevalência de isolados MDR foi observada em unidades pediátricas (46·4%) e maiores em unidades de cuidados intensivos, cardíacas (85·6%) e geral (83·5%),  $P < 0·001$ . Isolados recuperados em cultura de sangue apresentaram a menor taxa de perfil MDR (63·6%) enquanto isolados de feridas cirúrgicas (85·4%), apresentaram taxas maiores com esse perfil ( $P < 0·001$ ). O perfil MDR também estava presente em 80·5% dos isolados recuperados de secreções respiratórias, 77·3% de urina, 72,2% em ponta de cateter venoso central, e 83,0% em outras secreções.

Vinte e sete isolados com perfil MDR foram identificadas suas espécies (Complexo *A. baumannii/calcoaceticus*) e foram submetidos à tipagem molecular (tabela 1), sendo que, um desses foi o isolado resistente aos carbapenêmicos. Cinco clones distintos foram detectados entre esses isolados: um clone principal, clone A (17 isolados, 63·0%) com 5 subtipos (A1, 8 isolados; A2, 4; A3, 1; A4, 3; e A5, 1); clone B (6, 22·2%), clone C (2, 7·4%), clone D (1, 3·7%) e clone E (1, 3·7%), figura 1. Esses isolados foram recuperados de sangue (13 isolados, 41·1%), secreções respiratórias (7, 25·9%), ponta de cateter (3, 11·1%), feridas cirúrgicas(3, 11·1%) e outras secreções (1, 3·7%). Não existiu diferença

estatisticamente significativa de acordo com sítio entre os clones ( $P = 0.80$ ). A prevalência de cada clone na população de isolados de *Acinetobacter* spp. em nosso estudo foi estimado com 95% CI e 42,4 a 80,6% para o clone A, 8,6 a 42,3% para o clone B, 0,9 a 24,3% para o clone C, 0,1 a 19,0% para o clone, e 0,1 a 19,0% para o clone E.

## DISCUSSÃO

Nosso estudo mostrou que há uma taxa muito elevada de susceptibilidade em *Acinetobacter* spp. aos carbapenêmicos em nossa instituição, apesar de suas taxas relativamente elevadas de resistência a outros antimicrobianos. Na verdade, o *Acinetobacter* spp. MDR alcançou uma taxa geral de quase 80%, na maior parte, em UTIs e aumentou significativamente sobre o primeiro período estudado.

Nós podemos estabelecer a presença de cinco cepas MDR entre os isolados do Complexo *A. baumannii/calcoaceticus*, embora somente um pequeno número de isolados (27) fossem submetidos à tipagem molecular, um clone principal (clone A) e seus subtipos eram a maioria dos isolados MDR (63,0%, 95% CI 42,4 to 80,6%), e parece ser endêmico em nossa instituição. O segundo clone principal (B) primeiramente foi identificado entre isolados sensíveis aos carbapenêmicos, recuperados em 2005. Entretanto, este clone foi também recuperado novamente em 2006, e o primeiro resistente aos carbapenêmicos emergiu de um isolado deste clone. Estes achados estão de acordo com muitos estudos de epidemiologia molecular de *Acinetobacter* spp. que demonstram que a maioria das infecções endêmicas são causadas por uma cepa única, surgindo geralmente de uma fonte comum ou transmissão cruzada entre pacientes. <sup>(9)</sup>

Virtualmente nenhuma resistência aos carbapenêmicos foi observada em um período maior que 4 anos de seguimento, apesar das taxas extremamente elevadas de resistência a esta classe de drogas entre isolados de *P. aeruginosa* no mesmo período deste levantamento, como indicado por outros estudos de nossa instituição. <sup>(4,10,11)</sup> Esta classe de

antibióticos, entretanto, remanesce como droga de escolha no tratamento de infecções severas causadas por esse organismo em nossa instituição, enquanto que ampicilina/sulbactam pode ser uma alternativa, já que 82,7% dos isolados eram sensíveis a esta droga. Embora os isolados de 2004 não fossem analisados, nenhum isolado carbapenem resistente foi recuperado durante este período.

A pressão seletiva imposta pelo uso de antibiótico tem sido associada fortemente com a emergência da resistência antimicrobiana.<sup>(2,3,5)</sup> Entretanto, os dados deste e de outros estudos em nossa instituição sugerem que, ao menos para carbapenêmicos, o uso de antibióticos tem somente um papel relativo na emergência da resistência entre organismos não fermentadores neste hospital. Nossos resultados indicam que outros fatores também são importantes na epidemiologia da dinâmica de resistência antimicrobiana destes patógenos em infecção nosocomial.

Um destes fatores é a habilidade intrínseca do organismo de desenvolver resistência em um ambiente adverso. Entretanto, isto pode não explicar o caso do *Acinetobacter* spp. com sua capacidade tornar-se resistente a muitos agentes antimicrobianos, incluindo, carbapenêmicos, o que é comparável a *P. aeruginosa*.<sup>(2,3)</sup> O custo energético imposto para o desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos determina também o sucesso epidemiológico de um organismo resistente.<sup>(12)</sup> Da mesma forma, *Acinetobacter* spp. resistência aos carbapenêmicos tem sido relatada com frequência crescente,<sup>(1)</sup> tanto endêmica ou epidemicamente, sugerindo que isolados resistentes são em regra geral, tanto competitivos quanto suscetíveis, embora alguma vantagem energética específica entre cepas suscetíveis de nosso hospital não possa ser descartada. Apesar de um pequeno número de isolados analisados, os do clone B predominaram nos primeiros meses de 2006, e é possível que tal cepa tenha vantagem competitiva distinta as quais contribuiriam para sua prevalência e posterior disseminação de isolados com fenótipo resistente aos carbapenêmicos.

Em resumo, nosso estudo dá uma visão sobre fatores microbiológicos e epidemiológicos que podem determinar a resistência antimicrobiana em infecção nosocomial, e sugere que a epidemiologia dos perfis de resistência, ao menos entre os bacilos Gram-negativos não fermentadores, está dirigido não somente pelo consumo de antimicrobianos.

### **Agradecimentos**

Nós agradecemos a Unidade de Microbiologia – Laboratório de Patologia Clínica do HSL pelo auxílio na coleta dos isolados de *Acinetobacter*. Nós agradecemos em especial a Daniela, Taísa e Juliana pela ajuda. Este estudo (03-172) recebeu suporte financeiro do “Fundo de Incêntivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) - Hospital de Clínicas de Porto Alegre”.

**Tabela 1.** Perfil da macrorestrição do DNA, data do isolado, e perfil de susceptibilidade dos 27 isolados do Complexo *A. baumannii/calcoaceticus* submetidos à tipagem molecular.

Perfil da macrorestrição (n = 27)	Ano*				Susceptibilidade	
	2002	2003	2005	2006	IMP	IMP, AMS
A1 (n = 8)	2	1	4	1	8	0
A2 (n = 4)	2	2	0	0	2	2
A3 (n = 1)	0	0	1	0	0	1
A4 (n = 3)	0	0	2	1	3	0
A5 (n = 1)	0	0	1	0	1	0
B (n = 6) †	0	0	3	3	1	4
C (n = 2)	0	0	2	0	2	0
D (n = 1)	0	0	1	0	1	0
E (n = 1)	0	0	1	0	0	1

IMP, imipenem; AMS, ampicilina/sulbactam.

\*Não houve diferença significativa entre os clones distintos ao longo dos anos ( $p=0,50$ ).

† Um isolado foi resistente a todas as drogas, incluindo carbapenêmicos.

**Figura 1.** Perfil de macrorestrição do Complexo *A. baumannii/calcoaceticus* MDR no Hospital São Lucas da PUCRS.



Linhas 1,3,4,5,7,8,13,15,17 e 21: clone A e subclones; Linhas 2,10,11,16,19,20:clone B; Linhas 6,14:clone C; Linha 9:clone D; Linha 12 clone E; Linhas 18: não tipável; λ: marcador de peso molecular



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)