

NATACHA MARTINS

ASPECTOS DA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E PERFIS DE
RESISTÊNCIA DA COLONIZAÇÃO E INFEÇÃO POR
Acinetobacter spp. EM PACIENTES ADMITIDOS NO CENTRO
DE TRATAMENTO INTENSIVO DE UM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DO RIO DE JANEIRO



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadora: Profa. Beatriz Meurer Moreira



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
JULHO DE 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Martins, Natacha

Aspectos da epidemiologia molecular e perfis de resistência da colonização e infecção por *Acinetobacter* spp. em pacientes admitidos no centro de tratamento intensivo de um hospital universitário do Rio de Janeiro/ Natacha Martins – Rio de Janeiro, 2009

V, 76

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientador: Beatriz Meurer Moreira

Referências bibliográficas: f. 66-76.

1. *Acinetobacter* spp. 2. infecções associadas aos cuidados da saúde 3. centro de tratamento intensivo 4. gene *rpoB* I. Moreira Beatriz Meurer. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas. III. Aspectos da epidemiologia molecular da colonização e infecção por *Acinetobacter* spp. em pacientes admitidos no centro de tratamento intensivo de um hospital universitário do Rio de

Natacha Martins

ASPECTOS DA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E PERFIS DE RESISTÊNCIA DA COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO POR *Acinetobacter* spp. EM PACIENTES ADMITIDOS NO CENTRO DE TRATAMENTO INTENSIVO DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO RIO DE JANEIRO

Rio de Janeiro, 30 de julho de 2009

(Beatriz Meurer Moreira, Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias - IMPPG)

(Walter Oelerman, Doutor em Microbiologia - IMPPG)

(Maria Silvana Alves, Doutora em Ciências (Microbiologia) - UFJF)

(Renata Martins do Souto, Doutora em Ciências (Microbiologia) - IMPPG)

(Sérgio Fracallanza, Doutor em Ciências (Microbiologia) - IMPPG)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular das Infecções Bacterianas, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Prof^a. Beatriz Meurer Moreira.

AGRADECIMENTOS

- . À minha querida e adorável Prof^a Beatriz Meurer Moreira, por todo carinho, dedicação, orientação e confiança. Muito obrigada!
- . Ao Prof^o Rubens Dias por toda orientação, carinho e dedicação. Muito obrigada mesmo!
- . Ao Prof^o Armando Alves Borges Neto, por todo apoio e carinho.
- . Ao Prof^o Sérgio Eduardo Longo Fracalanza, por toda atenção.
- . A Prof^a Flávia Pellegrino, por todo apoio e atenção.
- . A todos do Laboratório de Epidemiologia Molecular: Miriam, Viviane, Flávia Valim, Carol, Valéria, Ana Paula, Rosana, Lívia, Ianick, Luciana, Andréia, Semirámis e Sr. Luiz...vocês foram essenciais!
- . A Talita Coelho, por toda colaboração e companheirismo. Muito obrigada!
- . A todos do Laboratório de Anaeróbios, por toda solicitude.
- . Ao Marlei Gomes da Silva, por toda atenção e apoio prestados.
- . À Dilma Cayres, por toda atenção e compreensão.
- . Ao Instituto de Microbiologia Prof^o Paulo de Góes na pessoa da Diretora Prof^a Agnes Marie de Sá Figueiredo.
- . À Coordenação do curso de pós-graduação na pessoa da Coordenadora Prof^a Ana Paula Colombo

Aos meus pais por todo seu amor e dedicação,
Ao meu noivo Leu pela compreensão e paciência
A toda a minha família e amigos pelo apoio.

Natacha Martins

ASPECTOS DA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO
POR *Acinetobacter* spp. EM PACIENTES ADMITIDOS NO CENTRO DE
TRATAMENTO INTENSIVO DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO RIO DE
JANEIRO

Orientadora: Beatriz Meurer Moreira

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Microrganismos do gênero *Acinetobacter* podem causar uma variedade de infecções, principalmente associadas aos cuidados com a saúde. O gênero tem sido considerado um agente infeccioso emergente, especialmente em pacientes admitidos em centro de tratamento intensivo (CTI). Em bactérias Gram-negativas, a produção de β -lactamases representa o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos; a produção de carbapenemases verdadeiras (oxacilinases), principalmente OXA-23, tem sido documentada em vários países nas espécies *Acinetobacter baumannii*. O Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) é um hospital público que dispõe de 527 leitos, onde infecções por amostras multirresistentes do gênero *Acinetobacter* emergiram desde o ano de 2001. Os objetivos do presente estudo foram identificar em espécies, determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, investigar a presença do gene *bla*_{OXA-23}^{similar} e determinar a composição clonal de amostras do gênero *Acinetobacter* isoladas em uma coorte de pacientes admitidos no CTI do HUCFF no período de março de 2007 a abril de 2008. Foram avaliadas 249 amostras consecutivas, sendo 211 (85%) obtidas de espécimes clínicos coletados para investigar a presença de colonização e 38 (15%) de infecção. A identificação do gênero foi realizada por meio de testes bioquímicos, e em espécies, por meio do sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB*. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados através da técnica de disco-difusão, conforme as recomendações do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). A presença do gene *bla*_{OXA-23}^{similar} foi pesquisada por PCR nas 158 amostras com resistência aos carbapenemas ou à ceftazidima, e em um grupo aleatório de 20 amostras susceptíveis a estes antimicrobianos. A diversidade genética foi determinada em teste de RAPD-PCR (iniciador M13). Dentre as 249 amostras, 166 (66,7%) foram identificadas como *A. baumannii*, 74 (29,5%) como Gen. sp. 13TU, duas (0,8%) como Gen. sp. 10 e uma (0,4%) como Gen. sp. próxima à 13TU. A identificação não pode ser determinada para 6 (2,6%) amostras. Resistência a todos os antimicrobianos testados foi observada em 22 (9%) das amostras. Considerando-se apenas uma amostra por cada paciente, a frequência de resistência aos carbapenemas foi de 59% (60/102 amostras). O gene *bla*_{OXA-23}^{similar} foi detectado em 134 (89,3%) de 150 amostras de *A. baumannii* e em apenas uma (7%) de 15 amostras da Gen. sp. 13TU investigadas. A tipificação molecular permitiu observar uma ampla variedade de genótipos. Contudo, 66% e 84% das amostras de *A. baumannii* e da Gen. sp. 13TU, respectivamente, foram incluídas em apenas 5 genótipos de cada espécie/genomoespécie. No presente estudo, o sequenciamento de um fragmento do gene *rpoB* revelou-se uma ferramenta simples e útil para a identificação de amostras de *Acinetobacter* em espécies. Elevadas prevalências de resistência foram observadas para todos os antimicrobianos investigados. As amostras revelaram uma composição clonal restrita, indicando intensa transmissão cruzada no ambiente do estudo.

Palavras-chave: *Acinetobacter* spp., infecções associadas aos cuidados da saúde, centro de tratamento intensivo, gene *rpoB*.

Rio de Janeiro
Julho de 2009

Natacha Martins

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY ASPECTS OF COLONIZATION AND INFECTION BY
Acinetobacter spp. IN PATIENTS ADMITTED TO INTENSIVE CARE UNITS AT A
UNIVERSITY HOSPITAL IN RIO DE JANEIRO

Orientadora: Beatriz Meurer Moreira

Abstract of master dissertation submitted to the Graduate Program in Biological Sciences (Microbiology), Institute of Microbiology Prof. Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, as part of the requirements necessary to obtain the title of Master in biological sciences.

Microorganisms of the genus *Acinetobacter* may cause a variety of infections mainly associated to healthcare. The genus is an emerging infectious agent, especially in patients admitted to intensive care units (ICU). In Gram-negative bacteria, β -lactamase production is the main mechanism of β -lactam resistance; production of true carbapenemases (oxacillinases), especially OXA-23, has been documented in many countries in *Acinetobacter baumannii*. Infections by multidrug-resistant *Acinetobacter* emerged in Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), a 527-bed public hospital, since 2001. The objectives of the present study were to identify at the species level, determine the antimicrobial susceptibility profile, investigate the presence of *bla*_{OXA-23}-like gene and determine the clonal composition of *Acinetobacter* isolates obtained from patients followed in a cohort at the ICU of HUCFF from March/2007 to April/2008. A total of 249 consecutive isolates were studied: 211 (85%) from clinical species corresponding to colonization and 38 (15%) from infection. The identification of the genus was performed by biochemical tests. Analysis of the sequence of a fragment of the *rpoB* gene was performed to identify species. Antimicrobial susceptibility was determined by disk-diffusion following CLSI recommendations. The *bla*_{OXA23}-like gene was investigated by PCR in the 158 isolates resistant to carbapenems or ceftazidime and in a random sample of 20 susceptible isolates. Strain typing was performed by RAPD with M-13 primer. Species identified were *A. baumannii* (166, 66.7% of isolates), Genomospecies 13TU (74, 29.5%), Genomospecies 10 (2, 0.8%) and Genomospecies close to 13TU (1, 0.4%). Resistance to all antimicrobial agents tested was detected in 22 (9%) of the isolates. Considering only one isolate/patient, resistance to carbapenems was 59% (60/102 isolates). The *bla*_{OXA23}-like gene was detected in 134 (89,3%) of the 150 *A. baumannii* isolates, and in only one (7%) of the 15 Genomospecies 13TU isolates. Molecular typing revealed isolates belonged to several RAPD types, but 66% and 84% of *A. baumannii* and Genomospecies 13TU isolates, respectively, belonged to only 5 genotypes of each species/genomospecies. In the present study, sequencing of a fragment of the *rpoB* gene was a simple and useful tool to identify *Acinetobacter* isolates at the species level. High resistance rates were observed to all antimicrobial drugs tested. The clonal composition was restricted, indicating cross-transmission of strains is intense in the ICU studied.

Key words: *Acinetobacter* spp., infections associated to healthcare, intensive care units, gene *rpoB*.

Rio de Janeiro
July 2009

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
ÍNDICE	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
INTRODUÇÃO	1
1. Características do gênero <i>Acinetobacter</i>	1
1.1. Identificação e taxonomia: a complexidade do gênero <i>Acinetobacter</i>	1
1.2. Fatores de virulência	7
2. Ocorrência de colonização e de infecção por <i>Acinetobacter</i> em seres humanos	9
3. Resistência aos antimicrobianos	10
3.1. Bombas de efluxo	11
3.2. Alteração de porinas	11
3.3. A produção de β -lactamases	12
4. Tipificação das amostras bacterianas	14
5. Justificativa do estudo	16
OBJETIVOS	16
MATERIAL E MÉTODOS	19
1. Desenho do estudo	19
2. Ambiente do estudo	19
3. Aspectos éticos	19
4. Caracterização fenotípica das amostras	19
4.1. Coloração de Gram	21
4.2. Teste da catalase	21
4.3. Teste da oxidase	21
4.4. Teste da mobilidade em gota pendente	22
4.5. Teste de oxidação/fermentação	22
5. Identificação das espécies de <i>Acinetobacter</i>	23

5.1. Extração do DNA	23
5.2. Condições de amplificação	24
5.3. Eletroforese em gel de agarose	24
5.4. Análise das sequências	25
6. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos	26
6.1. Método de disco-difusão	26
7. Detecção do gene <i>bla</i> _{OXA-23} similar	27
7.1. Extração do DNA	27
7.2. PCR simples	27
8. Tipificação molecular das amostras de <i>Acinetobacter</i> spp.	28
8.1. Extração do DNA	28
8.2. Interpretação dos resultados	29
9. Análise estatística	30
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ACB: Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*
ADC: “*Acinetobacter* derived cephalosporinases”/cefalosporinas cromossômicas
AFLP: “amplified fragment length polymorphism” /polimorfismo de fragmento de restrição
ARDRA: “amplified ribosomal DNA restriction analysis”/ análise de restrição do DNA ribossomal
ATS: Ágar triptcaseína de soja
BGNFF: bacilo Gram-negativo não-fermentador
bla: beta-lactamase
*bla*_{OXA-23}: gene que codifica a carbapenemase OXA-23.
BJ: Bouvet e Jean-Jean
CE: Clone Europeu
CCIH: Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
Clone SE: Clone Southeast
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CTI: centro de tratamento intensivo
DNA: Ácido desoxirribonucléico
EDTA: ácido etileno-diaminotetracético
ESBL: β-lactamases de espectro estendido
Gen. sp.: Genomoespécie
gyrB: gene que codifica a subunidade B da enzima DNA girase
HUCFF: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
MBLA: metalo-β-lactamase
MYSTIC : Programa de estudo da susceptibilidade aos carbapenemas
MLST: “multilocus sequence typing”/tipificação por sequenciamento de múltiplos locus
MPA: ácido 2-mercaptopropiônico (MPA)
MR: multirresistente
OXA: oxacilinase
PCR: “polymerase chain reaction” / reação em cadeia da polimerase
PFGE: “pulsed field gel electrophoresis” / eletroforese em campo pulsado
RAPD: “random amplified polymorphic DNA analysis” / reação de amplificação aleatória de DNA polimórfico
REP-PCR: “repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction” / técnica de PCR em sequências palindrômicas extragênicas repetidas
RFLP: “restriction fragment length polymorphism” / análise do polimorfismo dos macrofragmentos de restrição
recA: gene que codifica a proteína *recA*
rpoB: gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase
R/I: Resistência ou susceptibilidade intermediária
RM/ANVISA: Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em serviços de saúde
RND: família de transportadores do tipo “resistance-nodulation-cell division”
tDNA-PCR: análise do polimorfismo das regiões espaçadoras intergênicas do tRNA
TBE: tampão tris-borato EDTA
TSB: Caldo triptcaseína de soja
TU: Tjenberg e Ursing

1. Características do gênero *Acinetobacter*

1.1. Identificação e taxonomia: a complexidade do gênero *Acinetobacter*

Micro-organismos do gênero *Acinetobacter* compreendem bacilos Gram-negativos não-fermentadores, aeróbios estritos, imóveis, oxidase-negativos, catalase positivos, crescem facilmente em meios laboratoriais comuns, presentes na água, no solo e na microbiota de humanos e de animais (MUNOZ-PRICE & WEINSTEIN, 2008). Este patógeno humano é considerado um oportunista, podendo causar infecções graves especialmente em pacientes imunocomprometidos. Espécies do gênero *Acinetobacter* têm sido considerados agentes infecciosos emergentes em infecções associadas aos cuidados com a saúde durante as últimas três décadas (FOURNIER & RICHEL, 2006).

Acinetobacter é classificado na família *Moraxellaceae*, junto com *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Alkanindiges*, *Branhamella*, *Enhydrobacter* (ROSSAU *et al.*, 1991; PELEG, SEIFERT & PATERSON, 2008). Este micro-organismo foi nomeado inicialmente como *Micrococcus calco-aceticus*. Entretanto, em 1960, um estudo com investigação de características bioquímicas concluiu que este representava um novo gênero que passou a ser chamado de *Acinetobacter* contendo apenas a espécie *Acinetobacter calco-aceticus* (BAUMANN; DOUDOROFF & STANIER, 1968). Atualmente, estudos baseados na técnica de hibridização do DNA resultaram na descrição de 32 grupos homólogos chamados de genomoespécies dentro do gênero *Acinetobacter* (NEMEC *et al.*, 2009; VANECHOUTTE *et al.*, 2009; GUNDI *et al.*, 2009). Entretanto, apenas 19 destas genomoespécies já foram nomeadas e estão descritas no Quadro 1, enquanto que as outras 13 receberam apenas siglas (NEMEC *et al.*, 2009). Estas genomoespécies ainda não foram nomeadas porque são compostas por pequenos grupos de amostras (menos do que 10) ou o número de testes fenotípicos avaliados até o momento foi considerado insuficiente para permitir a plena caracterização do grupo.

Quadro 1. Classificação do gênero *Acinetobacter*

Espécies com nomes validados e genomoespécies não-nomeadas	Fonte de isolamento
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> *	Solo e humanos
<i>Acinetobacter baumannii</i> *	Solo, humanos, carne e vegetais
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Humanos
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Humanos e animais
<i>Acinetobacter junii</i>	Humanos
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Humanos e animais
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Humanos, animais e algodão
<i>Acinetobacter baylyi</i>	Lama medicinal e solo
<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	Ambiente, humanos e animais
<i>Acinetobacter bouvetii</i>	Lama medicinal
<i>Acinetobacter gerneri</i>	Lama medicinal
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	Humanos
<i>Acinetobacter parvus</i>	Humanos e animais
<i>Acinetobacter schindleri</i>	Humanos e animais
<i>Acinetobacter tandoii</i>	Lama medicinal
<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	Lama medicinal
<i>Acinetobacter townneri</i>	Lama medicinal
<i>Acinetobacter ursingii</i>	Humanos e animais
<i>Acinetobacter venetianus</i>	Oceanos
Genomoespécie 3 *	Humanos, solo e vegetais
Genomoespécie 6	Humanos
Genomoespécie 10	Humanos, solo e vegetais
Genomoespécie 11	Humanos e animais
Genomoespécie 13BJ (=14TU)	Humanos
Genomoespécie 14BJ	Humanos
Genomoespécie 15BJ	Humanos
Genomoespécie 16	Humanos e vegetais
Genomoespécie 17	Humanos e solo
Genomoespécie 13TU *	Humanos
Genomoespécie 15TU	Humanos
Genomoespécie entre 1 e 3	Humanos
Genomoespécie próxima a 13 TU	Humanos

* Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*. TU: Tjernberg and Ursing. BJ: Bouvet and Jean-Jean. Adaptada de DIJKSHOORN, NEMEC & SEIFERT, 2007. Bouvet & Grimont (1986); Bouvet & Jean-Jean (1989); Tjernberg & Ursing (1989); Gerner-Smidt & Tjernberg (1993).

O estudo da taxonomia do gênero *Acinetobacter* a partir de métodos genotípicos e fenotípicos exemplifica a dinâmica da taxonomia moderna. Em 1986, Bouvet e Grimont descreveram um sistema para identificação das espécies de *Acinetobacter* baseado em 28 testes fenotípicos, entre eles o crescimento nas temperaturas de 37°C, 41°C e 44°C, oxidação da glicose e utilização de 14 fontes de carbono. Neste estudo, a técnica de hibridização do DNA permitiu a descrição de 12 espécies, sendo 6 apenas numeradas devido ao pequeno número de características fenotípicas peculiares: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii* e *A. lwoffii*, Gen. sp. 3, Gen. sp. 6, Gen. sp. 9, Gen. sp. 10, Gen. sp. 11 e Gen. sp. 12. Um grupo se destacou por grande similaridade genotípica, porém, com possibilidade de diferenciação fenotípica: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii* e Gen. sp. 3. Estas espécies/genomoespécies podiam ser diferenciadas entre si por meio do crescimento nas temperaturas de 41°C e 44°C, produção de β -xilosidase e utilização de D-malato. Este grupo foi incluído posteriormente no complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB, descrito abaixo).

Em 1988, Nishimura e colaboradores identificaram uma nova espécie resistente a raios gama a partir de métodos fenotípicos e hibridização do DNA, isolada do solo e algodão. No ano seguinte, a partir de testes de hibridização do DNA, nos estudos de Tjenberg e Ursing (1989), três novas espécies de *Acinetobacter*, numeradas de 13 a 15, foram identificadas. As espécies estudadas receberam denominações correspondentes a estes numerais, seguidas da sigla TU (Gen. sp. 13TU, Gen. sp. 14TU e Gen. sp. 15TU). Ainda em 1989, Bouvet e Jean-Jean também estudaram espécies desse micro-organismo por metodologia de hibridização do DNA, que foram numeradas de 13 a 15 seguidas da sigla BJ (Gen. sp. 13BJ, Gen. sp. 14BJ e Gen. sp. 15BJ), além das genomoespécies 16 e 17.

Gerner-Smidt, Tjenberg e Ursing (1991) propuseram a definição do complexo ACB, formado de Gen. sp. 13TU juntamente com *A. calcoaceticus*, *A. baumannii* e Gen. sp. 3, devido às similaridades fenotípicas e genotípicas do grupo, descrito na Tabela 1 (GERNER-SMIDT; TJENBERG & URSING, 1991). Esse complexo seria caracterizado por compreender as amostras mais

frequentemente encontradas em espécimes clínicos humanos e aquelas mais resistentes a múltiplos antimicrobianos, com exceção da espécie *A. calcoaceticus*, que é ambiental (GERNER-SMIDT & TJENBERG, 1993; DIJKSHOORN, NEMEC & SEIFERT, 2007). Para facilitar a identificação de *Acinetobacter* spp. em laboratórios clínicos, além da inclusão no ACB, as espécies são classificadas em dois grupos na dependência do metabolismo de carboidratos: assacarolítico e sacarolítico (KONEMAN, 2006).

Tabela 1. Testes fenotípicos para as espécies do ACB

Testes	% amostras positivas entre as espécies (número de amostras testadas nos estudos A e B)*			
	<i>A. calcoaceticus</i> (8)/(10)	<i>A. baumannii</i> (25)/(121)	Gen. sp. 3 (20)/(15)	Gen. sp. 13TU (15)/(NI)
Crescimento				
44°C	0/0	100/100	0/0	NI**/73
41°C	0/10	100/100	100/60	NI/100
β-xilosidase	0/NI	95/NI	100/NI	NI/NI
Utilização de D-malato	0/90	98/100	100/100	NI/93

ACB: complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*. *Amostras testadas nos dois estudos que caracterizaram o ACB: A (BOUVET & GRIMONT 1986) e B (GERNER-SMIDT; TJENBERG & URSING 1991). ** NI: não investigado no estudo.

Continuando na caracterização das unidades taxonômicas de *Acinetobacter*, Gerner-Smidt e Tjernberg (1993) reconheceram duas genomoespécies adicionais, estreitamente relacionadas com o complexo ACB. Estas novas espécies foram designadas como “Gen. sp. entre 1 e 3”, e “Gen. sp. próxima à 13TU”. A partir da realização da técnica de “amplified fragment length polymorphism” (AFLP), Janssen e colaboradores (1997) relataram que Gen. sp. 9 e *A. lwofii* eram sinônimos, devendo permanecer apenas a denominação *A. lwofii*.

A partir de estudos de hibridização do DNA, AFLP, análise da

sequência do gene 16S rRNA e tratamento com enzimas de restrição do DNA ribossomal amplificado em reação de PCR (“amplified ribossomal DNA restriction analysis”, ARDRA), duas novas espécies foram descritas: *Acinetobacter schindleri* e *Acinetobacter ursingii* (NEMEC *et al.*, 2001). Neste estudo, *A. ursingii* foi caracterizada pela capacidade de causar bacteremia em pacientes hospitalizados. A partir destas mesmas técnicas, Nemeç e colaboradores (2003) descreveram a espécie *Acinetobacter parvus*.

Estudos de Carr e colaboradores (2003) descreveram sete novas espécies presentes em lama medicinal: *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. towneri*, *A. tandoii* e *A. gernerii*. Entretanto, foi observado posteriormente que a espécie *A. grimontii* era sinônima de *A. junii* porque tanto a sequência do gene 16S rDNA quanto as características fenotípicas dos supostos grupos não seriam tão diferentes entre si como publicado anteriormente, devendo ser mantida apenas a denominação *A. junii* (VANEECHOUTTE *et al.*, 2008).

Uma nova espécie causadora de infecções associadas aos cuidados da saúde foi descrita a partir da análise das sequências do 16S rDNA e do gene *rpoB* (KILLIC *et al.*, 2008). Neste estudo as amostras desta nova espécie não diferiam da *A. ursingii* fenotipicamente, a sequência completa do gene 16S rRNA e a sequência parcial do gene *rpoB* tiveram similaridade de 99,5% e 97,2%, respectivamente, apenas a partir do resultado de hibridização do DNA menor que 70% as amostras foram diferenciadas da espécie *A. ursingii*. Assim, foi proposta a espécie *Acinetobacter septicus*. Entretanto, Nemeç e colaboradores (2008) investigaram a relação entre estas espécies a partir da técnica AFLP e observaram que *A. septicus* possuía 97-98% de homologia com *A. ursingii*, e não poderia ser considerada uma nova espécie.

Amostras marinhas de *Acinetobacter* que degradam hidrocarbonetos e têm potencial aplicação industrial para a produção de bioemulsificantes foram nomeadas como *Acinetobacter venetianus* (DI CELLO *et al.*, 1997). No entanto, o nome desta espécie só foi validado e publicado no estudo de Vaneechoutte e colaboradores (2009), no qual cinco amostras foram

analisadas a partir de características fenotípicas, AFLP, ARDRA, análise do gene *rpoB* e análise do polimorfismo das regiões espaçadoras intergênicas do tRNA (tDNA-PCR).

A determinação das diferenças na sequência de nucleotídeos do gene *gyrB* e do gene 16S rRNA possibilitou ainda a descrição da nova espécie *Acinetobacter soli*, isolada do solo de uma floresta na Coreia (KIM *et al.*, 2008). A existência desta nova espécie foi validada em 2009 (KIM *et al.*, 2009). Ainda neste último ano foram identificadas duas novas espécies: *Acinetobacter gyllenbergii* e *Acinetobacter beijerinckii*, utilizando-se características fenotípicas, AFLP e ARDRA (NEMEC *et al.*, 2009).

Os testes fenotípicos para identificação para *Acinetobacter* spp. são adequados apenas para algumas espécies e a realização é demorada e trabalhosa. Assim como os sistemas comerciais utilizados na bacteriologia também não são satisfatórios devido ao crescente número de descrição de novas espécies de *Acinetobacter*, o que dificulta a frequente atualização dos métodos fenotípicos (DORTET *et al.*, 2006).

Métodos moleculares têm sido descritos para a identificação de *Acinetobacter* spp. para solucionar estes problemas na determinação da espécie. Um método classicamente utilizado para a identificação das espécies de *Acinetobacter* consiste na análise dos perfis de bandas obtidos na ARDRA. Entretanto, os padrões de bandas obtidos com esta metodologia são considerados de baixa natureza polimórfica, e por isso, ARDRA não possibilita a diferenciação entre muitas genomoespécies (VANEECHOUTTE *et al.*, 1995). Além disso, para maior acurácia na interpretação dos resultados desta técnica, é necessário que o laboratório possua todas as cepas de referência para que as comparações entre os tamanhos das bandas obtidas na restrição do DNA possam ser feitas com precisão. Desta forma, esta técnica está caindo em desuso, sendo substituída mais recentemente por métodos baseados em sequenciamento.

Como exemplificado acima, a análise de diversas sequências do DNA tem sido utilizada na identificação de espécies de *Acinetobacter*. As sequências investigadas são do 16S rDNA (IBRAHIM, GERNER-SMIDT &

LIESACK, 1997; CARR *et al.*, 2003; VANEECHOUTTE *et al.*, 2006), da região espaçadora 16S-23S (CHANG *et al.*, 2005), do gene *recA*, que codifica a proteína *recA* (KRAWCZYK *et al.*, 2002), *gyrB*, que codifica a subunidade B da enzima DNA girase (YAMAMOTO, BOUVET & HARAYAMA, 1999; KIM *et al.*, 2008) e *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA polimerase (LA SCOLA *et al.*, 2006; VANEECHOUTTE *et al.*, 2008; NEMEC *et al.*, 2009).

La Scola e colaboradores, em 2006, demonstraram que a determinação das sequências de nucleotídeos do gene *rpoB* e de segmentos das regiões espaçadoras deste gene (*rpIL-rpoB* e *rpoB-rpoC*) poderia ser útil na identificação das espécies de *Acinetobacter* (LA SCOLA *et al.*, 2006). Esta técnica tem sido utilizada com sucesso por alguns autores (VANEECHOUTTE *et al.*, 2008; NEMEC *et al.*, 2009). Gundi e colaboradores (2009) validaram o método de identificação por determinação da sequência do gene *rpoB* a partir da análise de amostras clínicas, sendo possível separar as espécies do complexo ACB.

1.2. Fatores de virulência

A capacidade de virulência das amostras de *Acinetobacter* spp. já foi motivo de controvérsia devido à frequência maior do achado deste micro-organismo associado apenas à colonização, comparado à infecção, o que obscurece o verdadeiro potencial patogênico do micro-organismo. Além disso, já foi questionado se o aumento da mortalidade observado quando os pacientes apresentam infecção por este micro-organismo estaria diretamente relacionado à infecção bacteriana ou à própria doença de base (FOURNIER & RICHET, 2006). Entretanto, atualmente é reconhecido que a gravidade de algumas infecções, como a pneumonia e a sepse, está certamente relacionada à presença de importantes fatores de virulência deste micro-organismo (JOLY-GUILLOU, 2005; FOURNIER & RICHET, 2006). Por exemplo, um estudo caracterizou 87 pacientes dos quais amostras do complexo ACB foram isoladas, a maioria resistentes a múltiplas drogas (SHELBURNE *et al.*, 2008). Apesar dos pacientes apresentarem um quadro de base muito semelhante, os que desenvolveram quadros infecciosos por

amostras do complexo ACB tiveram mortalidade mais elevada do que aqueles apenas colonizados (36,5 vs 13,6% respectivamente, p:0,009).

Algumas das características de *Acinetobacter* spp. que podem favorecer a virulência deste micro-organismo incluem: a propriedade de adesão a células epiteliais humanas através de fímbrias; a produção de lipopolissacarídeos (LPS), endotoxinas responsáveis por toxicidade letal em ratos; cápsula polissacarídica, que é citotóxica para células fagocíticas e favorece a invasão de tecidos devido à sua hidrofobicidade; produção de enzimas hidrolíticas responsáveis por danos aos tecidos lipídicos durante o processo de invasão e produção de sideróforos, que permitem a captação de íons necessários para a sobrevivência do micro-organismo no corpo humano (BERGOGNE-BEREZIN & TOWNER, 1996; JOLY-GUILLOU, 2005).

A habilidade de formação de biofilme por *Acinetobacter* spp. foi estudada em dispositivos implantados em pacientes e em materiais utilizados na produção destes dispositivos. Foi observado que havia formação de biofilme em superfícies abióticas, o que contribuía para uma maior virulência devido à citotoxicidade contra neutrófilos e inibição da migração destas células para o espaço peritoneal de camundongos (HENDRICKX, HAUSNER & WUERTZ, 2003; TOMARAS *et al.*, 2003).

Além disso, o estudo de sequências do genoma de *A. baumannii* revelou a presença de um grande número de ilhas de virulência, sugerindo que este organismo dispõe de uma considerável porção do seu DNA destinado à patogenicidade. Em 2006, Fournier e colaboradores descreveram uma ilha de patogenicidade em uma amostra de *A. baumannii* resistente a múltiplas drogas, chamada AbaR1, que continha 45 diferentes genes de resistência, dentre eles os genes que codificam as β -lactamases OXA-10, VEB-1, AmpC, diversas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e bombas de efluxo.

Finalmente, apesar da importância do estudo da virulência de cepas de *Acinetobacter* spp., vários aspectos do hospedeiro favorecem a ocorrência de infecção em pacientes colonizados. Dentre estes, são incluídos o tratamento antimicrobiano com cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas ou

carbapenemas, os procedimentos cirúrgicos, a presença de cateteres vasculares, traqueostomia, ventilação mecânica, longa permanência em Centros de Terapia Intensiva (CTI), a maior gravidade da doença de base e fatores imunológicos e nutricionais (GARNACHO-MONTERO *et al.*, 2003; MUNOZ-PRICE & WEINSTEIN, 2008). Por outro lado, algumas cepas acarretam quadros clínicos mais graves associados a uma maior mortalidade. No estudo de Shelburne e colaboradores (2008), a maioria das infecções foi ocasionada por um genótipo predominante de *A. baumannii*, caracterizado por PFGE, denominado de A. Foi observado que a mortalidade nos pacientes que desenvolveram infecção pelo genótipo A (45,5%) foi mais freqüente do que em pacientes com infecção por outros genótipos (18,6%, p: 0,007). Estes dados sugerem que a variabilidade na virulência dessas amostras poderia causar o desenvolvimento de doença invasiva.

2. Ocorrência de colonização e de infecção por *Acinetobacter* spp. em seres humanos

Como já foi dito anteriormente, o hábitat natural de *Acinetobacter* spp. é a água e o solo. Contudo, este micro-organismo já foi isolado também de alimentos e artrópodes. Em humanos, pode colonizar pele, feridas e trato respiratório e digestório (FOURNIER & RICHET, 2006; GRIFFITH *et al.*, 2006). *Acinetobacter* spp. é um patógeno capaz de causar tanto infecção comunitária como infecções associadas aos cuidados com a saúde. Como está amplamente distribuído no ambiente hospitalar, este micro-organismo é o segundo patógeno não-fermentador mais isolado em espécimes clínicos de humanos, sendo o mais freqüente *Pseudomonas aeruginosa*. Cepas de *Acinetobacter* spp. sobrevivem tanto em ambiente úmido como em superfícies secas por longos períodos (3 dias até 5 meses) (KRAMER, SCHWEBKE & KAMPF, 2006). Esta tolerância a ambientes secos facilita a ocorrência de surtos de infecções hospitalares (FOURNIER & RICHET, 2006). Desta forma, a transmissão de cepas entre múltiplos pacientes é favorecida pela combinação de vários fatores: a presença de pacientes colonizados, a extensão da contaminação ambiental e das mãos

dos profissionais da saúde, e a capacidade de adquirir resistência a múltiplas classes de antimicrobianos (VILLEGAS & HARTSTEIN, 2003).

No ano de 2006, foi implementada no Brasil a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em serviços de saúde (RM/ANVISA). Nesta rede, a ocorrência de infecções primárias da corrente sanguínea em pacientes internados em CTI é notificada sistematicamente por via eletrônica. Durante o período de julho de 2006 a junho de 2007, 76 hospitais brasileiros notificaram a ocorrência de infecções primárias da corrente sanguínea e o perfil de susceptibilidade dos micro-organismos prioritários isolados. Os hospitais notificantes estão distribuídos em 21 Estados da Federação, abrangendo as cinco regiões geográficas. *Acinetobacter* spp. foi o 4º micro-organismo mais isolado, seguindo *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa*, representando 11% do total de 2453 amostras notificadas.

3. Resistência aos antimicrobianos

As amostras de *Acinetobacter* spp. são naturalmente resistentes à penicilina e têm se tornado resistentes a muitas classes de antibióticos. Uma característica que provavelmente favorece a aquisição de novos mecanismos de resistência é a capacidade natural deste micro-organismo de exercer transformação, ou seja, incorporar DNA na forma livre. Por exemplo, a linhagem de *Acinetobacter baylyi* ADP1 sofre transformação em alta frequência, tendo sido considerada um modelo para análises genéticas (METZGAR *et al.*, 2004). Entretanto, dentro deste gênero, nem todas as espécies são naturalmente transformáveis (LORENZ & WACKERNAGEL, 1994). De fato, é desconhecido atualmente quais espécies de *Acinetobacter* spp. seriam naturalmente competentes e quais seriam as condições ambientais que poderiam facilitar a patogenicidade ou a aquisição de genes de resistência a antimicrobianos por este micro-organismo (PEREZ *et al.*, 2006).

Os carbapenemas são drogas utilizadas para o tratamento de infecções por *Acinetobacter* spp. multirresistentes. As enzimas β -lactamases,

principalmente as metalo- β -lactamases (MBLAs), assim como as β -lactamases conhecidas por oxacilinases, são responsáveis por grande parte da resistência. Recentemente, a emergência global de amostras resistentes a um grande número de antimicrobianos promoveu o reaparecimento do interesse em drogas mais antigas, como as polimixinas, como uma das únicas formas para o tratamento destas infecções (LI *et al.*, 2006).

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos descritos frequentemente em *Acinetobacter* spp. incluem a superexpressão de bombas de efluxo, a alteração de porinas e a produção de β -lactamases, conforme apresentado a seguir (MUNOZ-PRICE & WEINSTEIN, 2008).

3.1. Bombas de efluxo

A resistência a drogas mediada pelas bombas de efluxo é pouco estudada em *Acinetobacter* spp. O sistema de efluxo AdeABC pertence à família de transportadores do tipo “resistance-nodulation-cell division” (RND), e confere resistência a diversas classes de antimicrobianos. A sua superexpressão é regulada por mutações dos genes *adeS* ou *adeR* (HIGGINS *et al.*, 2004; MARCHAND *et al.*, 2004). Os sistemas do tipo RND são ubíquos em bactérias Gram-negativas e formam um complexo de três partes: proteínas na membrana periplásmica, um transportador RND na membrana interna, e um componente de membrana externa (OMF) (DAMIER-PIOLLE *et al.*, 2008). O aumento da expressão da bomba de efluxo AdeABC em conjunto com outros mecanismos de resistência contribuem para o fenótipo da multiresistência em amostras de *Acinetobacter* spp. (MAGNET, COURVALIN & LAMBERT, 2001). Outra bomba de efluxo da família RND descrita recentemente é a AdeIJK que, juntamente com a bomba AdeABC, contribui para resistência à tigerciclina (DAMIER-PIOLLE *et al.*, 2008).

3.2. Alteração de porinas

As porinas são proteínas de membrana externa (OMPs), e possuem

diversos papéis importantes no processo imunológico, fisiológico e genético das bactérias gram-negativas. A proteína CarO, de 29-kDa, constitui um poro para influxo de carbapenemas. A resistência aos carbapenemas pode surgir por sua perda ou sua modificação (SIROY *et al.*, 2005; POIREL & NORMAND, 2006).

3.3. A produção de β -lactamases

As classes moleculares de β -lactamases, definidas por Bush & Medeiros (1995), são A, B C e D. As classes A, C e D têm no sítio ativo uma serina e são inibidas pelo ácido clavulânico. A classe B corresponde às MBLA e tem no sítio ativo um íon metálico (zinco), sendo inibida pelos quelantes iônicos como o ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) ou ácido 2-mercaptopropiônico (MPA). Amostras de *Acinetobacter* spp. que apresentam pelo menos uma das quatro classes de β -lactamases já foram descritas.

As β -lactamases de classe A são clinicamente relevantes em *A. baumannii* porque conferem resistência a diversas cefalosporinas de espectro estendido, como a ceftazidima e o cefotaxime. Dentro da classe A, destacam-se em *Acinetobacter* spp. as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) TEM-92, isolada na Itália (ENDIMIANI *et al.*, 2007), VEB-1, na França (POIREL *et al.*, 2003), PER-1, nos EUA (HUJER *et al.*, 2006), SHV-12, na China e nos Países Baixos (HUANG *et al.*, 2004; NAIEMI *et al.*, 2005) e CTXM-2, na França (NAGANO *et al.*, 2004) e SCO-1, na Argentina (POIREL *et al.*, 2007).

A produção de MBLA tem sido descrita em *A. baumannii* de forma crescente. As MBLAs são capazes de hidrolizar todos os β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, com exceção do aztreonam. Foram descritas: VIM-1, na Grécia (IKONOMIDIS *et al.*, 2008), SIM-1, na Coreia do Sul (LEE *et al.*, 2005), IMP-1, na Argentina e Japão, pelo programa SENTRY de vigilância de resistência aos antimicrobianos (FRITSCHÉ *et al.*, 2005), IMP-2, na Itália (FRITSCHÉ *et al.*, 2005), IMP-4, em Hong Kong (CHU *et al.*, 2001), IMP-5, em Portugal (SILVA *et al.*, 2002), e IMP-11, no Japão (WALSH *et al.*, 2005).

As MBLAs descritas no Brasil entre amostras de *A. baumannii* são a IMP-1 (TOGNIM *et al.*, 2006) e a IMP-6 (GALES *et al.*, 2003) em São Paulo.

As β -lactamases de classe C são intrínsecas em *Acinetobacter* spp., e receberam a denominação de “*Acinetobacter* derived cephalosporinases” (ADC). As variantes ADC-1, 3, 4, 6 e 7 são encontradas em *A. baumannii* (BECEIRO *et al.*, 2004; HUJER *et al.*, 2005). O aumento da produção destas enzimas confere resistência às cefalosporinas, com exceção do cefepime e carbapenemas (CORVEC *et al.*, 2003).

As β -lactamases de classe D são conhecidas como carbapenemases verdadeiras ou oxacilinases (OXAs). As variantes OXA-51/69, também conhecidas como $bla_{OXA-51\text{similar}}$, são intrínsecas da espécie *A. baumannii* (POIREL & NORMAND, 2006). No entanto, estas β -lactamases são produzidas apenas quando ocorre a inserção do elemento IS*Aba1* em região adjacente ao gene bla_{OXA} . Desta forma, este elemento funciona como um promotor para a transcrição da β -lactamase (TURTON *et al.*, 2006).

Existem também as β -lactamases OXA adquiridas descritas em amostras de *Acinetobacter* spp. em diversos estudos. A primeira OXA adquirida com atividade de carbapenemase foi descrita a partir de uma amostra clínica de *Acinetobacter baumannii* isolada em 1985 na Escócia (PATON *et al.*, 1993). Este determinante de resistência, codificado por plasmídeo (inicialmente chamado ARI-1), foi anos mais tarde sequenciado e nomeado de bla_{OXA-23} (DONALD *et al.*, 2000). Poirel e colaboradores (2008), a partir de estudos para investigar qual seria o progenitor do gene bla_{OXA-23} , observou que amostras da espécie *A. radioresistens*, que compartilha o mesmo reservatório (pele de humanos) de *A. baumannii*, seriam a fonte do gene.

A variante OXA-23 foi detectada em vários países. No Brasil, amostras portadoras do gene bla_{OXA-23} foram detectados em Curitiba (DALLA-COSTA *et al.*, 2003) e no Rio de Janeiro (CARVALHO *et al.*, 2009). Outros países onde esta β -lactamase foi detectada são Coréia e Inglaterra (JEON *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2006a). Outros exemplos são a OXA-58, descrita em 3 continentes (COELHO *et al.*, 2006b), a OXA-24, na Coréia (JEON *et al.*,

2005) e a OXA-40, nos EUA (HUJER *et al.*, 2006). A classificação das carbapenemases naturais e adquiridas está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Carbapenemases do tipo OXA descritas em *Acinetobacter* spp.

Tipo de aquisição	Variantes
Naturais:	OXA-51/69símile: OXA-64,OXA-65,OXA-66, OXA-68, OXA-70, OXA-71, OXA-78, OXA-79, OXA-80, OXA-82
Adquiridas:	
Cromossômicas	OXA-24,OXA-25,OXA-26,OXA-40, OXA-58
Plasmidiais	OXA-23,OXA-58

Adaptada de PEREZ e colaboradores (2007).

4. Tipificação das amostras bacterianas

No estudo das doenças microbianas, técnicas de biologia molecular são utilizadas para determinar a transmissão de um agente infeccioso entre indivíduos dentro ou fora de hospitais (WISPLINGHOFF *et al.*, 2000). Este conhecimento é uma estratégia útil para identificar a magnitude de um surto, delinear seu reservatório, auxiliar no seu controle e produzir conhecimentos que podem ser utilizados na prevenção da disseminação deste patógeno (WISPLINGHOFF *et al.*, 2008).

Dentre as principais características epidemiológicas da ocorrência de infecções por *Acinetobacter* spp. se encontra a capacidade de disseminação deste micro-organismo. A maioria dos surtos descritos nos últimos anos são causados por cepas de *A. baumannii* resistentes a múltiplos antimicrobianos e ocorrem em CTI, onde a utilização de antibióticos é extensa (KRANIOTAKI *et al.*, 2006; SUNENSHINE *et al.*, 2007).

Na investigação epidemiológica da disseminação de cepas de *Acinetobacter* spp. que causam infecção ou colonização, a tipificação das cepas inclui diferentes metodologias moleculares. As técnicas já utilizadas incluem: a ribotipagem (BRISSE *et al.*, 2000; DESHPANDE, FRITSCHE &

JONES, 2004); “restriction fragment length polymorphism” (RFLP) (KUO *et al.*, 2004); “repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction”(REP-PCR) (BOU *et al.*, 2000); ARDRA (KOELEMAN *et al.*, 1998); “random amplified polymorphic DNA analysis” (RAPD) (GRUNDMANN *et al.*, 1997; KOELEMAN *et al.*, 1998); AFLP (VAN DESSEL, 2004); eletroforese em campo pulsado (PFGE) (COELHO, *et al.*, 2006a; CARVALHO *et al.*, 2009) e “multilocus sequence typing” (MLST) (BARTUAL *et al.*, 2005).

Algumas destas técnicas moleculares se distinguem quanto à facilidade de execução, o poder discriminatório e a reprodutibilidade. Uma técnica frequentemente utilizada tem sido o RAPD. Em estudo com 30 amostras coletadas durante 14 anos em 5 diferentes hospitais da Holanda, o RAPD apresentou maior poder discriminatório para *Acinetobacter* spp. do que o ARDRA (KOELEMAN *et al.*, 1998). Além disso, RAPD revelou reprodutibilidade interlaboratorial aceitável em estudo onde quatro pares de iniciadores diferentes e um protocolo padronizado foi empregado em sete laboratórios (GRUNDMANN *et al.*, 1997).

A utilização de técnicas de tipificação em estudo sobre a epidemiologia de infecções por *A. baumannii* permitiu a detecção de diversos clones internacionais caracterizados por PFGE, AFLP, e MLST. Primeiramente, foram descritos os Clones Europeu (CE) I e CE II, caracterizados por AFLP, que compreendiam amostras de surtos de diferentes localidades do noroeste da Europa (DIJKSHOORN *et al.*, 1995). Subsequentemente, o CE I e CE II se expandiram: o CE I foi encontrado na África do Sul, Espanha, Itália e Polônia, e o CE II na África do Sul, Espanha, França, Grécia, Portugal e Turquia (TURTON *et al.*, 2004). Já foi demonstrado que a carbapenemase OXA-58 estava envolvida na resistência aos carbapenemas no CE I e no CE II (POIREL *et al.*, 2005; D’AREZZO *et al.*, 2009).

O Clone Southeast (SE) foi caracterizado por PFGE e AFLP, sendo prevalente no sul da Inglaterra desde 2000. As amostras estudadas eram resistentes a ampicilina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefotaxime, gentamicina, ciprofloxacina e carbapenemas. Diferentemente dos anteriores, amostras do clone SE não carregam genes codificadores de carbapenemases

do tipo OXA ou MBLA (TURTON *et al.*, 2004).

Outro clone europeu, o CE III, foi descrito no ano de 2004 e caracterizado por AFLP e PFGE (VAN DESSEL *et al.*, 2004). O CE III foi encontrado na Espanha, França, Holanda e Itália.

Um outro clone importante, carreador do gene *bla*_{OXA-40} (OXA-24), foi descrito no ano de 2004 e caracterizado por PFGE, sendo prevalente em numerosos hospitais na Espanha e em Portugal (DA SILVA *et al.*, 2004). Já um clone produtor de VEB-1, caracterizado também por PFGE, se disseminou no nordeste da França e na Bélgica no final de 2003 a 2004 (NAAS *et al.*, 2006).

Os clones “Clone 1-OXA-23” e “Clone 2-OXA-23”, caracterizados a partir de PFGE, têm sido encontrados no sudeste da Inglaterra e em Londres desde 2005 (COELHO *et al.*, 2006a). No Brasil, a presença de um clone caracterizado por PFGE e portador do gene *bla*_{OXA-23}, que codifica a carbapenemase OXA-23, foi detectada em dois hospitais diferentes de Curitiba, e relatada no ano de 2003 (DALLA-COSTA *et al.*, 2003). Posteriormente, Carvalho e colaboradores (2009) relataram a presença de cinco genótipos de *A. baumannii* caracterizados por PFGE, produtores da carbapenemase OXA-23 portadores do gene *bla*_{oxa23} em oito hospitais diferentes no Rio de Janeiro.

5. Justificativa do estudo

A emergência de resistência a antimicrobianos entre bactérias Gram-negativas responsáveis por infecções associadas aos cuidados com a saúde, principalmente entre as espécies de *Acinetobacter*, representa um desafio para o manejo de pacientes admitidos em instituições de saúde. Neste contexto, a instituição de programas de vigilância epidemiológica sobre a ocorrência de patógenos com potencial epidêmico e o estudo dos mecanismos de resistência presentes nestes micro-organismos são estratégias importantes para minimizar o impacto ocasionado pelo surgimento e disseminação de cepas resistentes a múltiplas drogas.

Desta forma, o presente estudo foi desenhado para caracterizar

aspectos fenotípicos e genotípicos da identificação, da resistência e da tipificação de amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas de colonização e de infecção de pacientes admitidos em uma coorte recentemente acompanhada no CTI de um hospital universitário da cidade do Rio de Janeiro.

Objetivo Geral:

Caracterização de uma coleção de amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas de pacientes admitidos recentemente no CTI do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Objetivos específicos:

- 1) Identificar a nível de espécies amostras de *Acinetobacter* obtidas de diferentes espécimes clínicos;
- 2) Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos;
- 3) Determinar a presença do gene *bla*_{OXA-23}similar;
- 4) Determinar a composição clonal das amostras.

1. Desenho do estudo

No período de março de 2007 a abril de 2008, foi estabelecida uma coorte de pacientes admitidos no CTI do HUCFF, para estudo da epidemiologia molecular de *Acinetobacter* spp. responsável por colonização ou infecção. Todos os pacientes admitidos por um período maior do que 48h foram incluídos no estudo e acompanhados desde a admissão até a alta.

A pesquisa de colonização por *Acinetobacter* spp. foi realizada em espécimes obtidos de secreção traqueal e retal coletados à admissão no CTI, no terceiro dia de internação e a cada 7 dias até a alta. As amostras obtidas na coleta de espécimes clínicos para a investigação de episódios infecciosos foram também incluídas no estudo e denominadas de “amostras de infecção”.

2. Ambiente do estudo

O HUCFF é um hospital público afiliado à UFRJ que dispõe de 527 leitos hospitalares, sendo 14 do CTI. Ocorrem neste hospital cerca de 1.200 internações mensais, 50 das quais neste setor. A equipe do serviço de controle de infecção é constituída por sete médicos infectologistas, quatro enfermeiras intensivistas e equipe de suporte.

3. Aspectos éticos

O presente estudo é observacional. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUCFF.

4. Caracterização fenotípica das amostras

Foram analisadas 249 amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas de forma consecutiva a partir de diferentes sítios de colonização ou infecção de

102 pacientes, conforme apresentado na Tabela 3. Essas amostras foram isoladas de espécimes clínicos obtidos de pacientes internados no CTI, e mantidas a -20°C sob a forma de suspensões densas em leite desnatado (Molico – Nestlé, Araçatuba – São Paulo) a 10% (p/v) acrescido de glicerol (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 10% (v/v).

Tabela 3. Distribuição das 249 amostras de *Acinetobacter* spp. incluídas no estudo isoladas de 102 pacientes

Situação clínica	Número (%)	
	Amostras N = 249	Pacientes N=102
Colonização	211 (84)	95 (91) ^a
Infecção	38 (16)	28 (27) ^b

^a 21 pacientes com colonização também apresentaram infecção.

^b Cada paciente apresentou apenas uma infecção

As amostras de colonização incluídas no presente estudo foram obtidas por meio da semeadura dos espécimes clínicos em meio de ágar MacConkey (Difco, Detroit, USA), e incubação durante 24-48h, a 37°C, em aerobiose. As culturas foram examinadas à procura de colônias suspeitas de *Acinetobacter* spp. circulares, convexas, lisas, mucóides, com bordas definidas, variando de transparentes a levemente róseas, e opacas no ágar MacConkey (KONEMAN, 2006). Os testes fenotípicos realizados para a inclusão das amostras no gênero *Acinetobacter* foram: determinação das características morfotintoriais após coloração de Gram, produção da enzima oxidase, produção de catalase, teste de mobilidade em gota pendente, teste de oxidação/fermentação da glicose, conforme descrito a seguir. Para a realização dos testes foi utilizada a metodologia proposta por Lautrop (1994). Foram incluídas no gênero as amostras com morfologia de cocobacilos Gram-negativos, catalase positivas, oxidase negativas, imóveis e com metabolismo oxidativo da glicose ou assacarolíticas (LAUTROP, 1994).

4.1. Coloração de Gram

As características morfotintoriais das células bacterianas foram observadas através de preparações fixadas e tratadas pela coloração de Gram (Laborclin, Paraná, Brasil) e examinadas ao microscópio óptico (1000X), a partir das amostras semeadas e incubadas em estufa, a 35-37°C, durante 18-24 horas, em aerobiose. Na coloração foram observadas variações devido à sua dificuldade de descoloração. Como controles foram utilizados *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (cocos Gram positivos) e *A. baumannii* ATCC19606 (cocobacilos Gram negativos).

4.2. Teste da catalase

Uma suspensão bacteriana preparada a partir do ágar MacConkey (Difco) foi transferida com uma alça de platina para uma lâmina de vidro. Posteriormente, uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% foi depositada diretamente sobre os micro-organismos. A presença de bolhas indicou a hidrólise de H₂O₂ em O₂ e H₂O, confirmando a presença da catalase. As cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus pyogenes* ATCC19615 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

4.3. Teste da oxidase

Para a verificação da produção da enzima citocromo-oxidase, foi recuperada uma colônia bacteriana da amostra semeada e cultivada em ágar Mueller-Hinton (Difco) durante 18-24h, a 37°C. Com o auxílio de uma alça bacteriológica plástica, a colônia foi estendida em fita reativa impregnada com o reativo tetrametil p-fenilenodiamina a 1% (Probac, São Paulo, Brasil). A visualização de coloração púrpura no período de 10 segundos foi considerada indicativa de teste positivo. A amostra *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle positivo do teste, e *Escherichia coli* ATCC 25922, como controle negativo.

4.4. Teste da mobilidade em gota pendente

No teste da gota pendente foi utilizado crescimento no caldo triptcaseína de soja (TSB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) a 37°C por 24h, analisado sob a luz do microscópio óptico. Uma gota da suspensão bacteriana foi colocada sobre uma lamínula e em seguida a lamínula foi virada sobre uma lâmina escavada para visualização da mobilidade do micro-organismo. A amostra *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle positivo do teste e *A. baumannii* ATCC 19606, como controle negativo.

4.5. Teste de oxidação/fermentação

O teste de oxidação/fermentação (O/F) é utilizado para diferenciar micro-organismos de acordo com sua habilidade em oxidar ou fermentar açúcares específicos. Para realização do teste, dois tubos contendo o meio O/F (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), adicionado de glicose a 10% (Sigma, St. Louis, EUA) para obtenção de concentração final de 1%, são inoculados com o micro-organismo a ser testado, com auxílio de uma agulha estéril. Após a inoculação, um dos tubos é selado com 2,0 ml de óleo mineral, sendo criado assim um ambiente anaeróbico. Os dois tubos são incubados a 37°C por 24h, para posterior análise da mudança de cor. O micro-organismo em teste é definido como não-fermentador quando não se observa acidificação do meio no tubo coberto com óleo. A observação do tubo descoberto permite classificar o micro-organismo não-fermentador como assacarolítico (meio inalterado ou azulado) ou sacarolítico (meio amarelado). Como controles para metabolismo fermentativo e oxidativo foram utilizadas *Escherichia coli* ATCC25922 e *P. aeruginosa* ATCC27853.

5. Identificação das espécies de *Acinetobacter*

Para a identificação em espécies foram selecionadas todas as 38 amostras de infecção e, dentre as amostras de colonização, uma de cada genótipo de RAPD obtido de cada paciente (ver item 8, pág 27). As espécies foram determinadas a partir da análise da sequência de nucleotídeos de um fragmento do gene *rpoB* conforme proposto por La Scola e colaboradores (2006).

Para este estudo, o fragmento genético foi amplificado em reação de PCR utilizando um dos dois pares de iniciadores descritos na Tabela 4. O fragmento amplificado foi purificado, o DNA quantificado e enviado para sequenciamento. As sequências foram então analisadas para a identificação das espécies.

5.1. Extração do DNA

A extração do DNA celular total foi realizada segundo Dias e colaboradores (2008), com modificações. A amostra bacteriana foi crescida em ágar triptona de soja (ATS, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), durante 16-18 horas, a 35-37°C, em aerobiose; para este fim, foi utilizada a técnica de semeadura por esgotamento; a partir deste crescimento, uma colônia foi repicada em caldo TSB (Difco) e incubada por 16-18h a 35-37°C. O DNA foi extraído da seguinte forma: após a incubação, **(i)** 1ml do crescimento em caldo TSB foi transferido para microtubo de 1,5ml; **(ii)** a suspensão foi centrifugada a 17.000xg por 6 minutos, a 4°C; **(iii)** o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 200µl de água ultrapura livre de DNase e RNase (Gibco, USA); **(iv)** a suspensão foi novamente submetida à centrifugação a 17.000xg por 6 minutos, a 4°C; **(v)** o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 100µl de água ultrapura livre de DNase e RNase; **(vi)** a suspensão foi, por sua vez, submetida à fervura durante 10 minutos para rompimento das células; **(vii)** essa suspensão foi, então, mantida em banho de gelo por 20-30 minutos; **(viii)** após este período,

os debris celulares foram removidos por centrifugação a 17.000xg por 5 minutos, a 4°C, e o sobrenadante (DNA celular total) foi transferido para microtubo de 0,5mL e mantido a -20°C até sua utilização.

5.2. Condições de amplificação

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25µL contendo tampão da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 200µM de cada dNTP (Invitrogen), 1,8mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen), 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), e 3 µL da preparação contendo DNA molde.

As misturas de reação foram submetidas à amplificação que consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos e, posteriormente, um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

5.3. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à corrida em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% em tampão tris-borato EDTA (TBE) 0,5X (1M Tris base, 1M ácido bórico, 0,01 M EDTA, pH 8,2) a 100V. O gel foi corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) (Sigma, St. Louis, EUA) e fotografado sob luz ultravioleta. Como marcador de tamanho de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado “100 pb DNA ladder” (Invitrogen).

Os produtos de PCR foram purificados para sequenciamento com a utilização do kit DNA QIAquick (QIAGEN, Califórnia, EUA). Após purificar o produto, a quantidade de DNA obtida foi quantificada por meio de observação da intensidade da banda em eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 0,5X, em paralelo à escala “low DNA mass ladder” (Invitrogen). O sequenciamento do DNA foi realizado na Unidade Genômica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ. As sequências de ambas as fitas foram revisadas, alinhadas e editadas para a determinação da sequência

consenso de cada amostra com o auxílio do programa BioEdit versão 7.0.9.0 (HALL, 1999).

5.4. Análise das sequências

As sequências foram analisadas em duas etapas. Inicialmente, a sequência foi comparada àquelas depositadas no GenBank com o auxílio do programa de domínio público BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A espécie identificada foi aquela para qual é observada similaridade de ao menos 97%, conforme proposto por Drancourt e Raoult (2005). Em seguida, para confirmar a identidade das amostras, a sequência em estudo foi comparada em separado com aquelas utilizadas por La Scola e colaboradores (2006), Gundi e colaboradores (2009), Vaneechoutte e colaboradores (2009), e Nemec e colaboradores (2009), em alinhamento realizado com o auxílio do programa ClustalW Multiple Alignment, incorporado no Bioedit Sequence Alignment Editor, versão 7.0.4.1. O programa MEGA4 (TAMURA *et al.*, 2007) foi utilizado para a análise dos relacionamentos evolucionários com a construção de árvores filogenéticas. A relação evolucionária foi inferida utilizando-se o método de distância *neighbor-joining* (SAITOU & NEI, 1987); a significância do arranjo dos ramos foi avaliada por análise de *bootstrap* com 500 réplicas (FELSENSTEIN, 1985). As distâncias evolucionárias foram computadas em unidades do número de substituições de base por sítio utilizando-se o método *Kimura-2* (KIMURA, 1980). Todas as posições contendo lacunas ou faltando dados foram excluídas da análise.

Tabela 4. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento de fragmentos do gene *rpoB*

Gene	Nome do iniciador	Sequência oligonucleotídica (5' - 3')	Tm (°C)	Tamanho do produto (bp)
<i>rpoB</i> (zona 1)	Ac696F	TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG	60°C	350
	Ac1093R	CMACACCYTTGTTMCCRTGA	60°C	
<i>rpoB</i> (zona 2)	Ac1055F	GTGATAARATGGCBGGTCGT	60°C	450
	Ac1598R	CGBGCRTGCATYTTGTCRT	58°C	

Adaptada de La Scola e colaboradores (2006)

6. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

6.1. Método de disco-difusão

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada utilizando-se o teste de difusão em ágar conforme as recomendações contidas nos manuais do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2009). A partir de culturas obtidas pela semeadura em ATS (Difco) e incubação durante 18-24 horas, foram preparadas suspensões de cada amostra bacteriana em salina fisiológica estéril, correspondentes à turvação do padrão 0,5 da escala de McFarland. As suspensões foram semeadas utilizando-se “swabs” estéreis na superfície do meio ágar Mueller-Hinton (Difco). Posteriormente, discos de papel de filtro impregnados com antimicrobianos foram aplicados sobre o meio de cultura. Os antimicrobianos (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) testados foram: amicacina (30µg), ampicilina/ sulbactam (20 µg), cefepime (30µg), ciprofloxacina (5µg), ceftazidima (30µg), imipenem (10µg), gentamicina (10µg), meropenem (10µg), piperaciclina/tazobactam (100µg/10µg), sulfametoxazol/ trimetoprim (23,75µg/ 1,25µg), tobramicina (10µg). As culturas foram incubadas a 37°C por 16-18 horas, em aerobiose. A leitura das zonas de inibição e a interpretação dos resultados foram realizadas de acordo com as recomendações do CLSI (2009). Para controle do teste, foram utilizadas as cepas padrão recomendadas: *E. coli* ATCC® 25922 e *P. aeruginosa* ATCC® 27853.

7) Detecção do gene *bla*_{OXA23-símile}

As amostras resistentes a um dos carbapenemas testados (imipenem ou meropenem) ou à ceftazidima e em um grupo aleatório de 20 amostras susceptíveis a estes antimicrobianos foram submetidas a um teste de PCR simples para determinação da presença de genes que codificam a carbapenemase adquirida OXA-23 (JEON *et al.*, 2005). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão relatados na Tabela 5. A amostra utilizada como controle positivo para *bla*_{OXA-23símile} foi a PCC026, a partir da qual o fragmento de 1.058bp foi sequenciado. Nesta análise foi evidenciado que o fragmento apresentava sequência idêntica àquela depositada para o gene *bla*_{OXA-23símile} no GenBank sob o número de acesso FJ975152.

7.1. Extração do DNA

A extração foi a mesma realizada para identificação molecular em espécies de *Acinetobacter*, descrita no item 5.1.

7.2. PCR simples

A mistura da reação para amplificação do gene foi preparada em volume final de 25µL, contendo tampão *Taq* polimerase (Invitrogen), 200µM de cada dNTP (Invitrogen); 1,5mM MgCl₂ (Invitrogen); 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 5U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen) e 1µL da preparação contendo DNA molde. A amplificação foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: um ciclo inicial de 94°C por 2 minutos, 33 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos à corrida em gel de agarose a 1,5% em TBE 0,5X a 100V. O gel foi corado posteriormente com solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) (Sigma) e fotografado sob luz ultravioleta. Como padrão de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado “100 pb DNA ladder” (Invitrogen). O tamanho esperado do produto foi de

1.058 pb.

Tabela 5. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene *bla*_{OXA23-símile} em *Acinetobacter* spp.

Nome do iniciador	Sequência oligonucleotídica (5' - 3')	T _m (°C)	Tamanho do produto	Coordenadas*
OXA-23F	GATGTGTCATAGTATTCGTCGT	54	1.058 bp	-108 a -87
OXA-23R	TCACAACAACCTAAAAGCACTGT	55		929 a 950

Adaptado de Jeon e colaboradores, 2005. *Numeração correspondente às sequências depositadas no GenBank com números de acesso AJ132105 e AF201828, respectivamente.

8) Tipificação molecular das amostras de *Acinetobacter* spp.

Todas as amostras de *Acinetobacter* spp. foram estudadas através da técnica de RAPD com a utilização do oligonucleotídeo iniciador M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (GRUNDMANN *et al.*, 1997).

8.1. Extração do DNA

A amostra bacteriana foi crescida em ATS, durante 16-18 horas, a 35-37°C, em aerobiose. O DNA celular total foi liberado da seguinte forma : **(i)** foi preparada uma suspensão bacteriana em tampão salina-fosfato (“*phosphate buffer saline*” – PBS) pH 7,3, em um volume de 1 mL, correspondente à turvação padrão 0,5 da escala McFarland; **(ii)** a suspensão foi, então, centrifugada (17000xg por 6 minutos, a 4°C), sendo desprezado o sobrenadante; **(iii)** o depósito resultante da centrifugação foi ressuspenso em 200µL de água bi-destilada estéril; **(iv)** o passo ii foi repetido; **(v)** o sedimento foi ressuspenso novamente em 100 µL de água bi-destilada; **(vi)** a solução foi, por sua vez, submetida à fervura por 10 minutos para rompimento das células; **(vii)** os debris celulares foram, então, removidos por centrifugação

(17000xg por 2 minutos, a 4°C) e o sobrenadante, recuperado e mantido a -20°C, durante, pelo menos, 30 minutos.

Para amplificação, a mistura da reação foi preparada em um volume total de 25µL contendo tampão de *Taq* polimerase (Invitrogen); 1,5mM MgCl₂ (Invitrogen); 200µM de cada dNTP (Invitrogen); 1µM do oligonucleotídeo iniciador M13; 5U *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen) e 1µL da preparação contendo DNA molde.

A amplificação foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: ciclo inicial de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 20 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

Após a amplificação, alíquotas de 12µl de cada produto de PCR adicionados de 10µl de tampão de corrida foram aplicadas nos respectivos orifícios e submetidas à corrida em gel de agarose a 1,5% em TBE 0,5X. A corrida eletroforética foi realizada inicialmente a 50 volts por 10 minutos, passando a 100 volts até o término da corrida. O gel foi corado em uma solução de 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Sigma) e fotografado sob luz UV. Para referência de tamanho de DNA foi utilizado o marcador de “1kb plus DNA ladder” (Invitrogen), aplicado em todo gel analisado.

8.2. Interpretação dos resultados

Para analisar os resultados da tipificação, foram consideradas apenas as bandas de tamanho compreendido entre 400bp e aproximadamente 3000bp. Esta escolha foi baseada na observação da reprodutibilidade do perfil de bandas de uma mesma amostra incluída em todos os géis realizados. Inicialmente, os padrões de bandas foram avaliados por inspeção visual, e posteriormente, com o auxílio do programa GelCompar II, versão 4.01 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Dendogramas foram construídos com a utilização do índice de Dice e o método “unweighted pair group method with arithmetic average” (UPGMA) (VAN BELKUM *et al.*, 2007).

Os padrões de bandas do DNA amplificado foram interpretados e comparados sem considerar a origem das amostras (colonização ou

infecção). Primeiramente, as amostras de um mesmo paciente foram analisadas, e aquelas que possuíam padrões de bandas indistinguíveis entre si na inspeção visual, foram incluídas em um único genótipo. As amostras que diferiam em uma ou mais bandas foram incluídas em genótipos distintos. As diferenças relativas à intensidade e forma das bandas não foram consideradas (VAN BELKUM *et al.*, 2007). Para a comparação de amostras de diferentes pacientes, foram construídos dendogramas com a inclusão de uma amostra de cada genótipo de cada paciente. A classificação final dos genótipos após a comparação das amostras de todos os pacientes entre si foi realizada como descrito na análise das amostras de cada paciente.

9. Análise estatística

Na comparação das frequências de resistência foi utilizado o teste do quiquadrado ou teste exato de Fisher, quando apropriado, com o auxílio do programa EPI Info versão 6.0 (DEAN *et al.*, 1994). Foram considerados como estatisticamente significativos os resultados que revelaram valores de $p \leq 0,05$.

1. Amostras bacterianas

1.1. Caracterização fenotípica das amostras

No presente estudo, foram recuperadas e caracterizadas 249 amostras de *Acinetobacter* spp. a partir de 102 pacientes. As amostras foram identificadas no gênero *Acinetobacter* pois revelaram crescimento em ágar MacConkey, metabolismo não-fermentador, produção de catalase, aspecto morfotintorial de cocobacilos Gram-negativos, ausência da produção de citocromo-oxidase e ausência de mobilidade.

Foram isoladas a partir de secreção traqueal 63% das amostras de busca ativa de colonização, e a partir do sangue foram isoladas 37% das amostras de infecção. Na Tabela 6 são mostradas as frequências de isolamento de amostras de acordo com a fonte de isolamento.

Tabela 6. Distribuição das 249 amostras de *Acinetobacter* spp. incluídas no estudo de acordo com os espécimes clínicos de isolamento

Espécime Clínico	Número e (%) de amostras		
	Colonização	Infecção	Total
Secreção traqueal	133 (63,0)	10 (26,0)	143 (57,4)
Secreção retal	48 (23,0)	0	48 (19,3)
Secreção de orofaringe	23 (10,8)	0	23 (9,2)
Sangue	0	14 (37,0)	14 (5,7)
Ponta de cateter	0	10 (26,3)	10 (4,0)
Lavado bronco-alveolar	3 (1,4)	1 (2,7)	4 (1,6)
Secreção abdominal	1 (0,4)	2 (5,3)	3 (1,2)
Secreção de ferida operatória	3 (1,4)	0	3 (1,2)
Liquor	0	1 (2,7)	1 (0,4)
Total	211	38	249

1.2. Identificação das amostras de *Acinetobacter* em espécies

Todas as amostras obtidas de infecção foram identificadas em espécies. Dentre as amostras de colonização, foi selecionada ao menos uma amostra de cada genótipo de RAPD, totalizando 65 amostras.

Na Figura 1 é representado o produto de 350pb obtido a partir da amplificação do fragmento denominado “zona 1” do gene *rpoB*. Na Figura 2, está representada a árvore filogenética das 38 amostras de infecção. Na Figura 3 está representada a árvore filogenética das 65 amostras de colonização.

Na Tabela 7 estão representados os resultados de todas as amostras conforme a comparação com sequências depositadas no GenBank. A amostra agrupada na árvore filogenética (Figura 3) próximo à espécie *A. tandoii* (PCC024) não pode ter sua identificação confirmada, porque na comparação com as sequências depositadas no GenBank, a maior similaridade observada foi de 87%, para a amostra de *A. baylyi* ADP1 número de acesso CR543861. Para exploração adicional deste resultado foi construída uma árvore filogenética com as seguintes sequências parciais (zona 1) do gene *rpoB*: a amostras PCC024, as cepas incluídas na árvore proposta por La Scola e colaboradores (2006) *A. tandoii* DQ207491 e *A. baylyi* DQ207472, e a cepa *A. baylyi* ADP1 CR543861 para a qual foi observada a maior similaridade no GenBank. Esta árvore filogenética está representada na Figura 4. Observou-se que esta amostra do estudo (PCC024) ficou no mesmo ramo da espécie *A. baylyi* ADP1, entretanto outra sequência de *A. baylyi* ficou em outro segmento indicando que não foi possível classificar esta amostra em espécie. Além desta, outras cinco amostras não puderam ter sua identificação em espécie determinada porque não foi possível amplificar fragmentos do gene *rpoB* (zona 1 e 2) para estudo.

Na Tabela 8 são apresentadas as frequências finais de cada espécie entre todas as amostras do estudo.

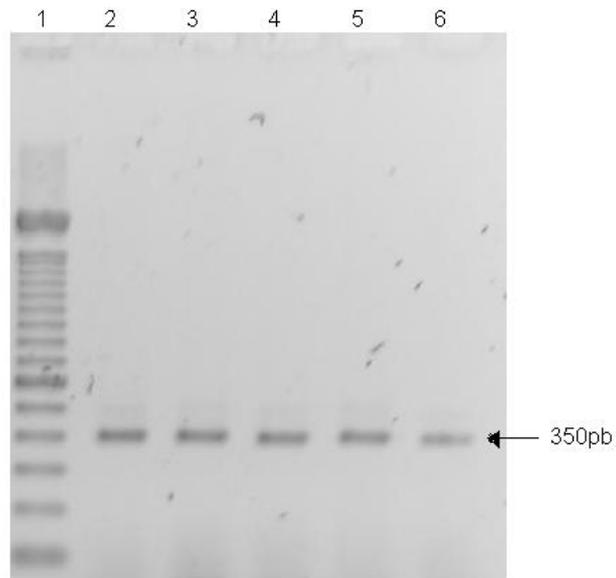


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose do fragmento de 350pb da zona 1 do gene *rpoB* amplificado em PCR a partir de amostras de *Acinetobacter* spp. Linha 1 representa o marcador de tamanho de DNA (“100bp DNA ladder”). Linhas 2, 3, 4, 5 e 6 representam o produto obtido das amostras PCC036, PCC113, PCC015, PCC042 e PCC534, respectivamente.

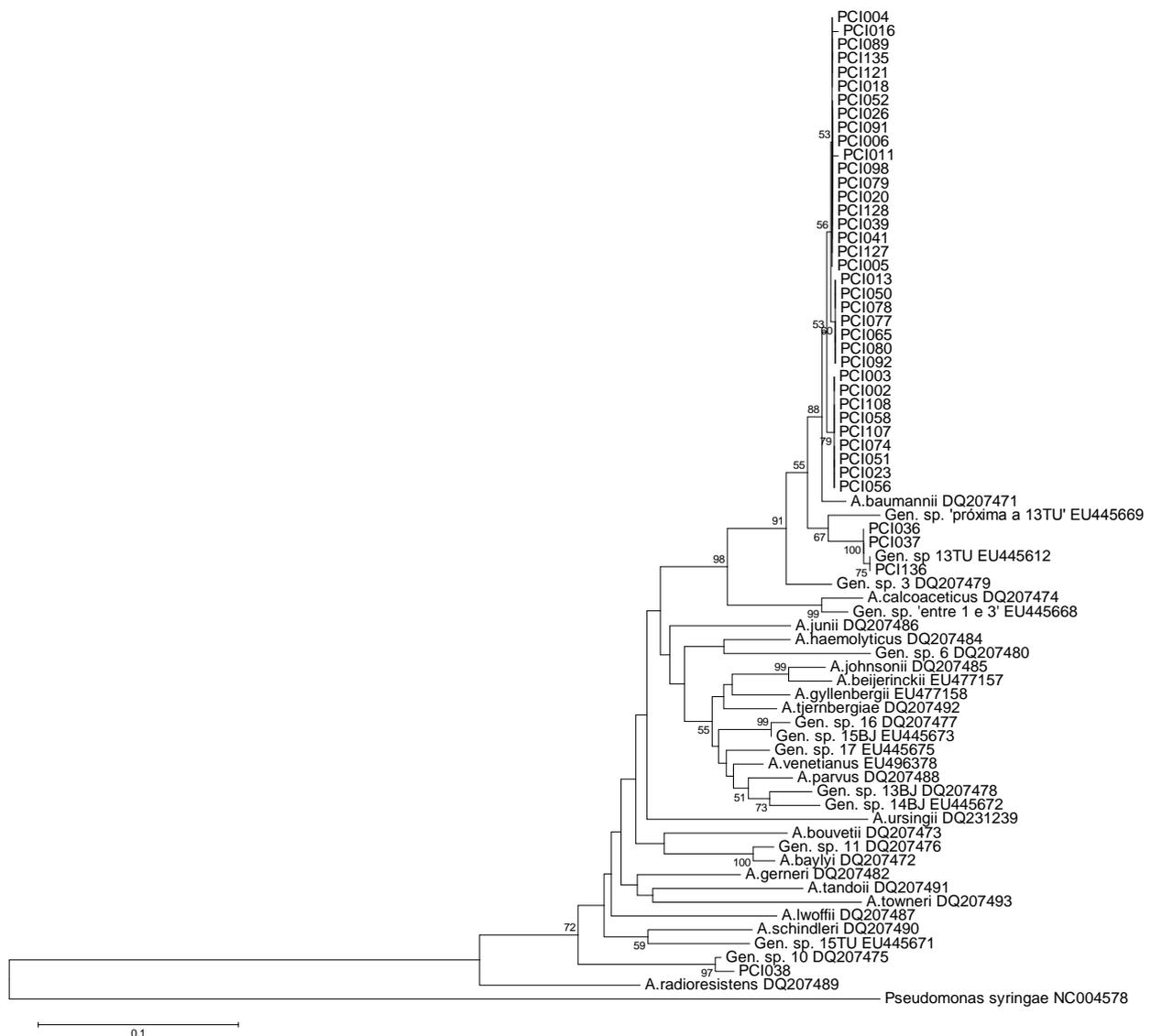


Figura 2. Árvore filogenética derivada de sequências parciais do gene *rpoB* de 38 amostras de infecção de *Acinetobacter* spp. e 34 amostras de referência determinada pelo método de neighbor-joining, utilizando o modelo Kimura-2. A significância do arranjo dos ramos foi avaliada por análise de *bootstrap* com 500 réplicas e os números na árvore indicam a ocorrência (%) desses arranjos; apenas valores acima de 50% são mostrados.

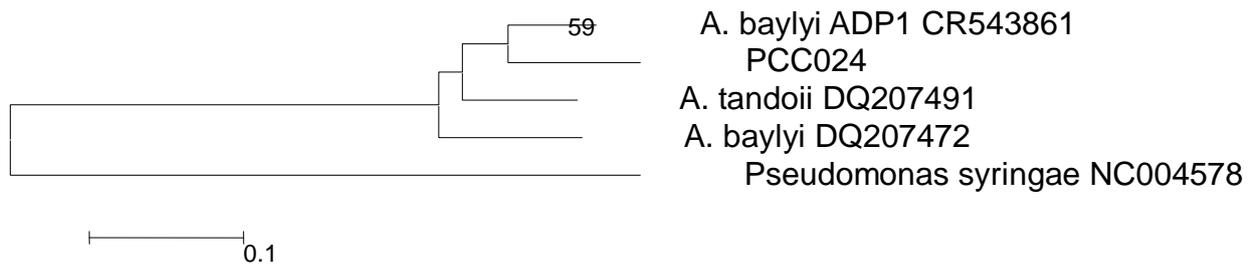


Figura 4. Árvore filogenética derivada de sequências parciais do gene *rpoB* da amostra PCC024 de *Acinetobacter* spp. e 4 amostras de referência determinada pelo método de neighbor-joining, utilizando o modelo Kimura-2. A significância do arranjo dos ramos foi avaliada por análise de *bootstrap* com 500 réplicas e os números na árvore indicam a ocorrência (%) desses arranjos; apenas o valor acima de 50% é mostrado.

Tabela 7. Distribuição das amostras identificadas em espécies de acordo com a similaridade da sequência parcial do gene *rpoB* (zona 1) com sequências depositadas no GenBank

Espécie/ genomoespécie	Amostras	Nº de amostras (n=103)	% de similaridade	Nº. GenBank
<i>A. baumannii</i>	PCC162, PCC103, PCC751, PCC290, PCC501, PCI005, PCI006, PCI135, PCC489, PCI004, PCI098, PCC025, PCI026, PCC266, PCI089, PCC404, PCC433, PCC510, PCI052, PCI091, PCI127, PCI020, PCC513, PCC119, PCI128, PCC182, PCI121, PCI039, PCC109, PCI079, PCI041, PCI016, PCI011, PCC172	34	99	FJ715473
	PCC582, PCC004, PCC040, PCC036, PCC038, PCI018, PCC017, PCC245, PCC026 PCI107, PCI058, PCI056, PCI051, PCC580, PCI074, PCI002, PCI023, PCI003, PCC312, PCC011, PCC042, PCC056, PCC660	9	100	FJ715473
	PCI108, PCC074, PCC094	14	99	EU445603
	PCI077, PCI078, PCI065, PCI092, PCI013, PCC748, PCC221, PCC058, PCC759, PCC630	3	100	EU445603
	PCC750	10	100	CU468230
	PCC113, PCI080, PCI050	1	99	CU468230
	PCC535, PCC534, PCC032	3	100	EU445597
	PCC313	3	99	FJ715474
	PCC148	1	99	CP000521
		1	99	EF611385
	Gen. sp. 13TU	PCC101, PCC163, PCC589, PCC015, PCC209, PCC631, PCC508, PCI036, PCI037	9	99
PCI136, PCC626, PCC731, PCC515, PCC039		5	100	EU445680
PCC521, PCC752, PCC347, PCC815		4	99	EU445629
PCC722, PCC326, PCC287		3	100	EU445629
Gen. sp. 10	PCC517, PCI38	2	98	EU445665
Gen. sp. próxima à 13TU	PCC738	1	99	EU445669

*Uma amostra não revelou similaridade $\geq 98\%$ com nenhuma das sequências depositadas no GenBank.

Tabela 8. Distribuição das 249 amostras identificadas em espécies de acordo com a análise da sequência de fragmento do gene *rpoB*

Espécie/genomoespécie	N ^o e (%) amostras		
	Colonização* (n=211)	Infecção (n=38)	Total (n=249)
<i>A. baumannii</i>	134 (63,4) ⁴⁴	32 (84,0)	166 (66,7)
Gen. sp. 13TU	69 (33,0) ¹⁷	5 (13,0)	74 (29,5)
Gen. sp. 10	1 (0,4) ¹	1 (3,0)	2 (0,8)
Gen. sp. próxima à 13TU	1 (0,4) ¹	0	1 (0,4)
NID	6 (2,8)	0	6 (2,6)

*Apenas uma amostra de cada um dos genótipos observados no RAPD foi sequenciada. A identificação das demais amostras foi inferida devido a um perfil indistinguível no RAPD com a amostra sequenciada. O índice numérico indica o número de amostras sequenciadas de cada espécie/ genomoespécie. NID: amostras não identificadas em espécie.

1.3. Susceptibilidade aos antimicrobianos

Todas as 249 amostras incluídas no estudo foram avaliadas quanto à susceptibilidade a 11 antimicrobianos por método de disco-difusão. Na exploração destes resultados, foram calculadas proporções que utilizaram diferentes coleções de amostras. Estas diferentes coleções são descritas a seguir.

(i) Para o cálculo da taxa global de resistência aos antimicrobianos, apenas uma amostra por cada um dos 102 pacientes do estudo foi selecionada. No caso dos pacientes a partir dos quais várias amostras haviam sido obtidas, aquela amostra com resistência a maior número de antimicrobianos foi selecionada. Este procedimento foi realizado para evitar que amostras com o mesmo perfil isoladas de um mesmo paciente alterassem o cálculo final da frequência de resistência. Dentro desta coleção, foram comparadas também as taxas de resistência reveladas por amostras resistentes aos carbapenemas com aquelas detectadas nas amostras susceptíveis aos carbapenemas.

(ii) Para a comparação entre as taxas de resistência obtidas entre as amostras de colonização e as amostras de infecção, foi selecionada uma amostra de cada paciente em cada grupo. Desta forma, 28 amostras de infecção foram selecionadas (uma por paciente), no entanto, 21 pacientes que apresentaram infecção também apresentaram colonização. Portanto, 95 amostras de colonização foram incluídas nesta seleção.

(iii) Os perfis de resistência foram descritos para a totalidade das amostras, sendo apresentados em separado para cada uma das espécies (em uma tabela para as 166 amostras de *A. baumannii* e para as 74 de Gen. sp. 13TU, e no texto para as demais).

Na Tabela 9 estão discriminados os resultados de susceptibilidade global aos 11 antimicrobianos das 102 amostras selecionadas. Amostras resistentes foram computadas juntamente com aquelas de susceptibilidade intermediária. O menor percentual de amostras resistentes ou intermediárias (R/I) (39%) foi observado para amicacina, sendo os maiores percentuais

observados para sulfametoxazol/ trimetropim (86%) e ciprofloxacina (74%).

O percentual de resistência aos carbapenemas (59%) foi elevado. Como a resistência a este antimicrobiano pode ser adquirida através de plasmídeos que carregam diversos mecanismos de resistência, foi investigado no estudo se a susceptibilidade a outros antimicrobianos era diferente quando amostras resistentes aos carbapenemas fossem comparadas às susceptíveis. Estes resultados são mostrados na Tabela 10. Várias diferenças foram observadas na comparação entre os resultados dos dois grupos. No entanto, somente 4 destas foram estatisticamente diferentes. A resistência para 3 (cefepime, ciprofloxacina e sulfametoxazol/ trimetropim) dos 9 antimicrobianos testados foi significativamente mais elevada entre as amostras com resistência aos carbapenemas. Por outro lado, inesperadamente, a susceptibilidade à amicacina foi significativamente maior neste último grupo.

Para investigação de diferenças significativas na susceptibilidade aos antimicrobianos para as amostras de colonização e infecção, uma nova coleção foi formada. Nesta nova seleção, foi escolhida uma amostra de colonização e uma de infecção para cada paciente. A Tabela 11 indica os percentuais de resistência aos 11 antimicrobianos discriminados para as 93 amostras de colonização e 28 de infecção (uma amostra por paciente).

Na análise dos perfis de resistência, foi observada R/I a todos os antimicrobianos em 22 (8,8%) amostras. Os perfis de resistência aos antimicrobianos dentre as amostras de *A. baumannii* (166 amostras) e Gen. sp. 13TU (74 amostras) estão descritos na Tabela 12. As duas amostras de Gen. sp. 10, a amostra de Gen. sp. próxima a 13TU e três das amostras não classificadas em espécie foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Uma das amostras não identificadas foi susceptível apenas à ciprofloxacina, gentamicina e sulfametoxazol/ trimetropim; outra foi susceptível ao meropenem ciprofloxacina, ceftazidima, piperaciclina/ tazobactan e sulfametoxazol/ trimetropim; e outra foi susceptível à ciprofloxacina, tobramicina, gentamicina e sulfametoxazol/ trimetropim.

Tabela 9. Distribuição das frequências de resistência aos antimicrobianos em 102 amostras de *Acinetobacter* spp. (1 amostra por paciente)

Antimicrobiano	Número e (%) de amostras*		
	R	I	I/R
Sulfametoxazol/trimetropim	88 (86)	0	88 (86)
Ciprofloxacina	68 (66)	8 (8)	76 (74)
Cefepime	65 (64)	1 (1)	66 (65)
Piperaciclina/tazobactam	63 (62)	0	63 (62)
Imipenem**	60 (59)	0	60 (59)
Meropenem**	60 (59)	0	60 (59)
Ceftazidima	56 (55)	3 (3)	59 (58)
Ampicilina/sulbactam	54 (53)	4 (4)	58 (57)
Gentamicina	48 (47)	4 (4)	52 (51)
Tobramicina	48 (47)	3 (3)	51 (50)
Amicacina	38 (37)	2 (2)	40 (39)

*R: resistentes; I: intermediárias. I/R: R+I

**As mesmas amostras resistentes ao imipenem foram também resistentes a meropenem.

Tabela 10. Percentual de resistência aos antimicrobianos em 102 amostras de *Acinetobacter* spp. (uma amostra por cada paciente) conforme a susceptibilidade aos carbapenemas

Antimicrobiano	Nº e % de amostras	
	Resistentes (N=60)*	Sensíveis (N=42)
Amicacina	32 (52)	34 (83)**
Ampicilina/sulbactam	54 (88)	39 (95)
Cefepime	60 (98)	34 (83)**
Ciprofloxacina	59 (96)	24 (58)**
Ceftazidima	51 (83)	34 (83)
Piperaciclina/tazobactam	60 (98)	37 (90)
Tobramicina	38 (62)	29 (70)
Gentamicina	37 (60)	30 (73)
Sulfametoxazol/trimetropim	60 (98)	12 (29)**

*Todas as amostras que apresentaram resistência a um carbapenema (imipenem ou meropenem) também revelaram resistência ao outro.

** $p < 0,05$ para a comparação entre os valores observados entre as amostras resistentes aos carbapenemas e nas amostras susceptíveis. A comparação entre todos os outros valores não apresentou diferença com significado estatístico.

Tabela 11. Resistência a 11 antimicrobianos em amostras de colonização e infecção incluídas no estudo

Resistência	N ^o de amostras (%)	
	Colonização (n=93)	Infecção (n=28)
Sulfametoxazol/trimetopim	80 (86)	23 (82)
Ciprofloxacina	69 (74)	26 (93)
Cefepime	62 (66)	21 (75)
Piperaciclina/tazobactam	58 (62)	21 (75)
Imipenem	54 (58)	20 (71)
Meropenem	54 (58)	20 (71)
Ceftazidima	52 (56)	19 (68)
Ampicilina/sulbactam	54 (58)	16 (57)
Gentamicina	49 (52)	13 (46)
Tobramicina	46 (49)	16 (57)
Amicacina	37 (39)	11 (39)

*A comparação entre todos os outros valores não apresentou diferença com significado estatístico.

Tabela 12. Perfis de resistência^a aos antimicrobianos observados nas amostras de *A. baumannii* e Gen. sp. 13TU

Perfis de resistência ^b	Número e (%) de amostras		
	<i>A.baumannii</i> (n= 166)	Gen. sp. 13TU (n= 74)	Total (n= 240)
IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT	22 (13)	0	22 (9,2)
IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT	44 (27)	1 (1,3)	45 (19)
IMP MER AMS CAZ CIP TOB AMI PTZ FEP SXT	8 (5)	0	8 (3,3)
IMP MER AMS CAZ CIP AMI PTZ FEP SXT	14 (8)	1	15 (6,3)
IMP MER AMS CAZ CIP TOB PTZ FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
IMP MER AMS CAZ CIP GEN PTZ FEP SXT	2 (1,2)	0	2 (0,8)
IMP MER CAZ CIP TOB AMI PTZ FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ	0	1 (1,3)	1 (0,4)
AMS CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
IMP MER AMS CAZ CIP PTZ FEP SXT	10 (6)	0	10 (4,2)
IMP MER AMS CAZ AMI PTZ FEP SXT	0	2 (3)	2 (0,8)
IMP MER AMS CAZ GEN TOB FEP SXT	0	1 (1,3)	1 (0,4)
IMP MER AMS CIP AMI PTZ FEP SXT	21 (12,6)	0	21 (8,7)
IMP MER CIP GEN TOB PTZ FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
AMS CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT	6 (3,6)	0	6 (2,5)
IMP MER CAZ CIP PTZ FEP SXT	5 (3)	0	5 (2,1)
IMP MER CIP AMI PTZ FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
IMP MER CIP GEN TOB AMI SXT	3 (1,8)	0	3 (1,2)
AMS CAZ GEN TOB PTZ FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
CAZ CIP GEN AMI PTZ FEP SXT	2 (1,2)	0	2 (0,8)
AMS CIP GEN TOB AMI SXT	0	1 (1,3)	1 (0,4)
CAZ CIP GEN TOB PTZ SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
CAZ CIP AMI PTZ FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
CIP GEN TOB AMI FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
MER CAZ CIP AMI FEP	0	1 (1,3)	1 (0,4)
CAZ CIP AMI FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
CAZ CIP PTZ FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
CIP GEN TOB FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
CIP GEN TOB AMI FEP	0	2 (3)	2 (0,8)

^aAvaliado em teste de disco-difusão em ágar (CLSI 2009); ^bResistência somada à susceptibilidade intermediária; IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AMI: amicacina; PTZ: piperaciclina/ tazobactam; FEP: cefepime; SXT: sulfametoxazol/ trimetopim.

Tabela 12 (Continuação). Perfis de resistência^a aos antimicrobianos observados nas amostras de *A. baumannii* e Gen. sp. 13TU

Perfis de resistência ^b	Número e (%) de amostras		
	<i>A.baumannii</i> (n= 166)	Gen. sp. 13TU (n= 74)	Total (n= 240)
AMS AMI GEN TOB	1 (0,6)	0	1 (0,4)
CIP GEN TOB SXT	1 (0,6)	6 (8,2)	7 (3)
CAZ CIP SXT	1 (0,6)	1 (1,3)	2 (0,8)
CIP FEP SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
CIP PTZ SXT	1 (0,6)	0	1 (0,4)
GEN TOB SXT	0	2 (3)	2 (0,8)
CIP SXT	0	5 (7)	5 (2,1)
FEP SXT	0	1 (1,3)	1 (0,4)
CIP	1 (0,6)	6 (8,2)	7 (3)
TOB	1 (0,6)	0	1 (0,4)
FEP	0	1 (1,3)	1 (0,4)
SXT	0	26 (35,2)	26 (11)
Susceptível a todos antimicrobianos ^c	8 (5)	16 (22)	24 (10)

^aAvaliado em teste de disco-difusão em ágar (CLSI 2009); ^bResistência somada à susceptibilidade intermediária; IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AMI: amicacina; PTZ: piperaciclina/ tazobactam; FEP: cefepime; SXT: sulfametoxazol/ trimetropim.

2. Detecção do gene *bla*_{OXA-23}similar

A presença do gene *bla*_{OXA-23}similar foi investigada por meio de PCR nas 158 amostras de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenemas (imipenem ou meropenem) ou à ceftazidima, e em 20 amostras susceptíveis a estes antimicrobianos escolhidas aleatoriamente. O fragmento correspondente de DNA de 1.058pb (Figura 5) foi observado em 135 (85,3%) das 158 amostras resistentes investigadas. Entre as amostras susceptíveis não houve detecção do gene.

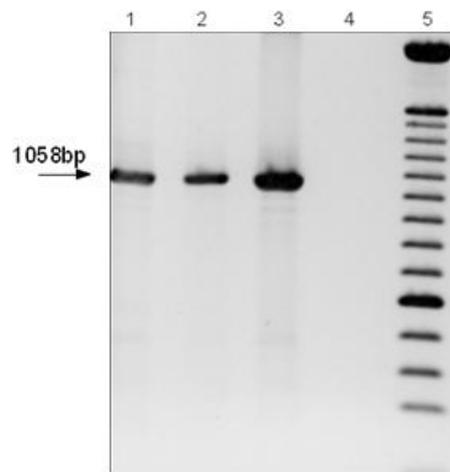


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose do fragmento de 1.058pb compatível com o gene *bla*_{OXA-23} em amostras de *Acinetobacter* spp. Linha 1, 2 e 3 representam as amostras PCC026, PCC036 e PCC041, respectivamente. Linha 4 representa uma amostra resistente aos carbapenemas e negativa para a presença do gene. Linha 5 representa o padrão de tamanho molecular (“100bp DNA ladder”).

3. Caracterização da composição clonal das amostras de *Acinetobacter* spp.

A diversidade genômica das 249 amostras de *Acinetobacter* spp. foi investigada através da técnica de RAPD. Não foi possível tipificar 5 amostras (nestes casos, apenas um rastro de DNA foi observado após a eletroforese) (3 eram *A. baumannii* e duas não foram identificadas em espécie). Para as 246 amostras restantes, foi obtido um perfil passível de interpretação, contando com 7 a 14 bandas de DNA amplificado. Na Figura 6 são exemplificados alguns dos perfis genotípicos obtidos.

As 249 amostras analisadas pertenciam a 29 genótipos distintos entre as amostras de *A. baumannii* e 12 genótipos entre as amostras de Gen. sp. 13TU. Os genótipos foram nomeados com uma ou duas letras do alfabeto em maiúscula. Desta forma, os genótipos observados em *A. baumannii* foram: A, B, C ... W, X, Y, Z, AB, AC, AD e AE. Os genótipos observados em Gen. sp. 13TU foram: A, B, C ... L. Os cinco genótipos mais frequentes entre as amostras de *A. baumannii* foram A, B, D, E, G, nos quais foram incluídas 109 (66%) amostras. Entre as amostras da Gen. sp. 13TU, os cinco genótipos mais frequentes foram A, B, C, D e E, nos quais foram incluídas 64 (84%) amostras. Na Tabela 13 está descrita a distribuição dos genótipos principais de *A. baumannii* e de Gen. sp. 13TU entre as amostras e os pacientes dos quais foram isoladas.

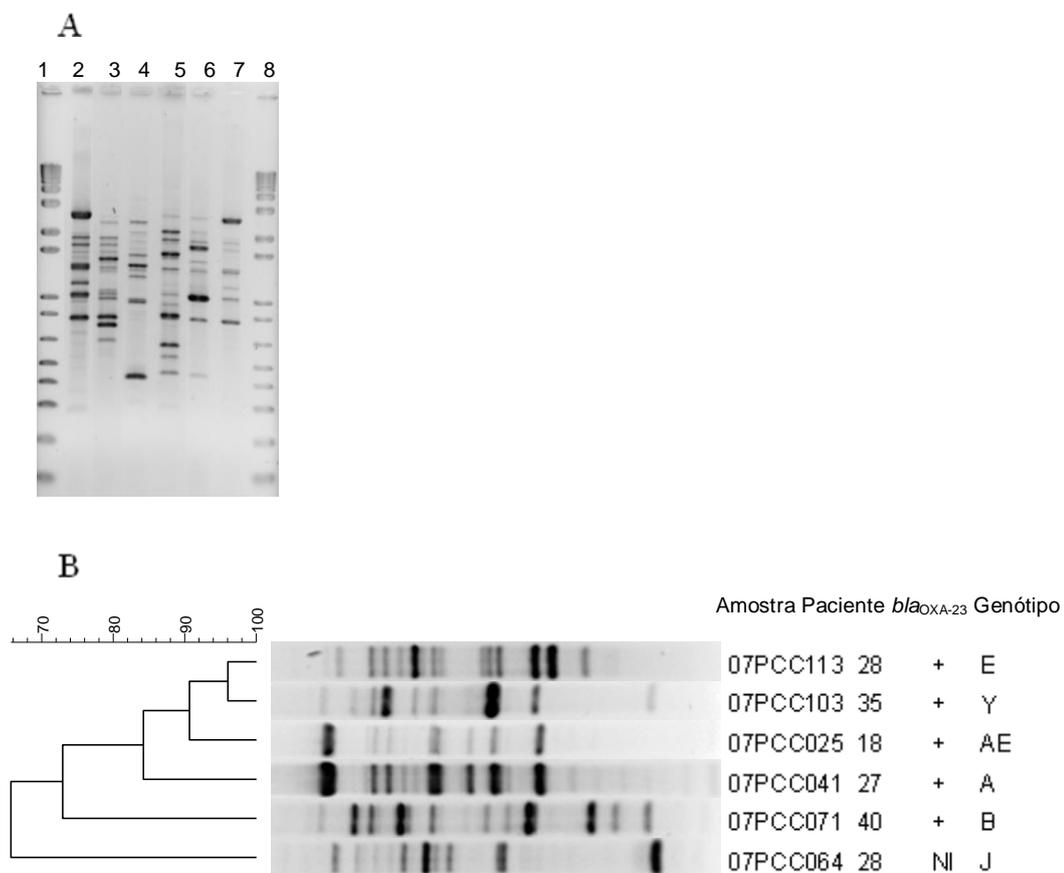


Figura 6. Perfis de bandas obtidos na genotipagem por RAPD em um gel representativo: A, linhas 1 e 8, marcador de tamanho de 1kb plus; linha 2,3,4,5,6,7, amostras PCC041, PCC113, PCC064; PCC071; PCC103 e PCC025, respectivamente. B, dendograma obtido da análise computadorizada dos perfis apresentados em A.

Tabela 13. Distribuição dos 5 principais genótipos de RAPD de *A. baumannii* e da Gen. sp. 13TU

Espécie/genomoespécie	Genótipo	Número e % (sobre o total na espécie/genomoespécie)	
		Amostras	Pacientes
<i>A. baumannii</i> (n=166)	A	25 (23)	12 (20)
	B	23 (21)	12 (20)
	D	21 (19)	10 (16)
	E	22 (20)	12 (20)
	G	18 (17)	15 (24)
	Total	109 (66)	45 (76)*
Gen. sp. 13TU (n=74)	A	26 (40)	24 (45)
	B	15 (23)	9 (17)
	C	10 (16)	9 (17)
	D	7 (11)	7 (13)
	E	6 (10)	4 (8)
	Total	64 (84)	42 (88)*

* Alguns pacientes apresentaram amostras de mais de um genótipo: 9 pacientes tiveram amostras de *A. baumannii* incluídas em 2 ou 3 genótipos diferentes, e 6 pacientes tiveram amostras de Gen. sp. 13TU incluídas em dois genótipos diferentes, cada um deles.

4. Correlação entre genótipos, perfis de resistência e presença do gene

bla_{OXA-23}similar

Os genótipos de *A. baumannii* foram caracterizados por amostras resistentes a múltiplas drogas. A susceptibilidade a todos os antimicrobianos ou resistência a apenas um antimicrobiano foram observadas em apenas 10 (6%) amostras. Dentre todas as 166 amostras de *A. baumannii*, 135 (81,3%) apresentavam resistência aos carbapenemas. Um total de 128 (95%) destas amostras resistentes foi positiva para o gene bla_{OXA-23}similar. As 6 amostras portadoras do gene e susceptíveis aos carbapenemas apresentavam resistência à ceftazidima e também a pelo menos outros 4 antimicrobianos.

Os genótipos da Gen. sp. 13TU caracterizaram-se pela susceptibilidade a todos antimicrobianos testados ou resistência a apenas um antimicrobiano em 43 (58%) amostras. A R/I aos carbapenemas (meropenem ou imipenem) foi observada em apenas 7 (9%) das 74 amostras. A presença do gene bla_{OXA-23}similar foi investigada entre 15 das 74 amostras de Gen. sp. 13TU, e detectado em somente uma (7%), que apresentava resistência aos carbapenemas.

Nas Tabelas 14, 15 e 16 estão descritos os perfis de resistência observados nos diferentes genótipos para as 249 amostras incluídas no estudo, relacionados com a presença do gene bla_{OXA-23}.

Tabela 14. Distribuição dos perfis de resistência a antimicrobianos^a, presença do gene *bla_{oxa23}-símile* e genótipo RAPD nas amostras de *A. baumannii* que apresentaram perfis de resistência diversos dentro de um mesmo genótipo

Genótipo (n ^o de amostras)	Perfil de resistência ^b (n ^o de amostras)	<i>bla_{oxa23}-símile</i>
A (26)	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT (22)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT (3)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP PTZ FEP SXT (1)	+
B (23)	IMP MER AMS CAZ CIP AMI PTZ FEP SXT (14)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT (4)	+
	IMP MER CAZ CIP PTZ FEP SXT (3)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP PTZ FEP SXT (1)	+
	CIP GEN TOB SXT (1)	ni
D (22)	IMP MER AMS CIP AMI PTZ FEP SXT (19)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT(1)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT(1)	+
	IMP MER CIP AMI PTZ FEP SXT (1)	+
E (19)	IMP MER AMS CAZ CIP TOB AMI PTZ FEP SXT (8)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT (3)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP PTZ FEP SXT (2)	+
	IMP MER CAZ CIP PTZ FEP SXT (2)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP TOB PTZ FEP SXT (1)	+
	IMP MER CAZ CIP AMI TOB PTZ FEP SXT (1)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP GEN PTZ FEP SXT (1)	+
CIP FEP SXT (1)	ni	
G (18)	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT (9)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT (8)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP PTZ FEP SXT (1)	+
I (8)	CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT (3)	-
	CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT(2)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT (1)	-
	CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT (1)	+
	CIP GEN TOB AMI FEP SXT (1)	ni
K(6)	IMP MER AMS CAZ CIP PTZ FEP SXT (2)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT (1)	+
	IMP MER AMS CIP AMI PTZ FEP SXT (1)	+
	IMP MER AMS CIP AMI PTZ FEP SXT (1)	+
	CIP PTZ SXT (1)	ni
M (4)	MER AMS CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT(1)	-
	AMS CIP CAZ GEN TOB PTZ FEP SXT (1)	-
	AMS CAZ GEN TOB PTZ FEP SXT (1)	-
	CIP GEN TOB FEP SXT (1)	ni
U (2)	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT(1)	+
	IMP MER AMS CAZ CIP PTZ FEP SXT (1)	+
X (2)	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT (1)	+
	MER CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT (1)	+
O (2)	IMP MER AMS CAZ CIP PTZ FEP SXT (1)	+
	IMP MER CIP GEN TOB AMI SXT (1)	-

^aAvaliado em teste de disco-difusão em ágar (CLSI 2009); ^bResistência somada à susceptibilidade intermediária; IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AMI: amicacina; PTZ: piperaciclina/ tazobactam; FEP: cefepime; SXT: sulfametoxazol/ trimetropim. *: presente; -: ausente; ni: não investigado.

Tabela 15. Distribuição dos perfis de resistência aos antimicrobianos^a, presença do gene *bla_{oxa23}-símile* e genótipo RAPD nas amostras de *A. baumannii* com apenas um perfil para cada genótipo

Perfil de resistência ^b (n° de amostras)	Genótipo (n° amostras)	<i>bla_{oxa23}-símile</i>
IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT(7)	C (3), F (4)	+
IMP MER AMS CAZ CIP GEN PTZ FEP SXT (1)	F (1)	+
IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT(1)	AE (1)	+
IMP MER AMS CAZ CIP PTZ FEP SXT(3)	L (1), nt (2)	+
IMP MER CIP GEN TOB AMI SXT (2)	S (1)	-
MER AMS CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT (1)	H (1)	-
CAZ CIP GEN AMI PTZ FEP SXT (1)	H (1)	-
AMS CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP SXT (1)	J (1)	+
IMP MER CIP GEN TOB PTZ FEP SXT (1)	AD (1)	-
CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ FEP (1)	T (1)	-
CAZ CIP AMI PTZ FEP SXT(1)	Y (1)	+
CAZ CIP GEN TOB PTZ SXT (1)	N (1)	-
CAZ CIP AMI FEP SXT (1)	Q(1)	+
AMI AMS GEN TOB (1)	nt (1)	ni
CIP CAZ SXT (1)	P (1)	-
CIP (1)	V (1)	ni
TOB (1)	Z (1)	-
Susceptibilidade a todos antimicrobianos (8)	P (2), W (1), R (1)	ni
	P (2), W (1), R (1)	-

^aAvaliados em teste de disco-difusão em ágar (CLSI 2009); ^bResistência somada à susceptibilidade intermediária; IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AMI: amicacina; PTZ: piperaciclina/ tazobactam; FEP: cefepime; SXT: sulfametoxazol/ trimetropim. nt: amostra não tipificável. +: presente; -: ausente; ni: não investigado.

Tabela 16. Distribuição dos perfis de resistência^a aos antimicrobianos, presença do gene *bla*_{oxa23}-símile e genótipo RAPD nas amostras da Genomoespécie 13TU

Genótipo (n° de amostras)	Perfil de resistência ^b (n° de amostras)	<i>bla</i> _{oxa23} - símile
A (26)	CIP (5)	ni
	CIP GEN TOB SXT (3)	ni
	SXT (3)	ni
	IMP MER AMS CAZ CIP AMI PTZ FEP SXT (1)	-
	CIP GEN TOB AMI FEP (1)	-
	CIP GEN TOB AMI FEP (1)	ni
	CIP GEN TOB SXT (1)	-
	Susceptível a todos antimicrobianos (8)	ni
	Susceptível a todos antimicrobianos (2)	-
B (15)	SXT (8)	ni
	CIP SXT (3)	ni
	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB AMI PTZ (1)	-
	CAZ CIP SXT (1)	-
	FEP (1)	ni
	SXT (1)	-
	Susceptível a todos antimicrobianos (1)	ni
C (10)	SXT (7)	ni
	IMP MER AMS CAZ AMI PTZ FEP SXT (1)	+
	AMS CIP GEN TOB AMI SXT (1)	ni
	Susceptível a todos antimicrobianos (1)	ni
D (8)	SXT(2)	ni
	IMP MER AMS CAZ GEN TOB FEP SXT (1)	-
	MER CAZ CIP AMI FEP (1)	-
	GEN TOB FEP SXT (1)	-
	FEP SXT (1)	ni
	CIP SXT (1)	ni
	Susceptível a todos antimicrobianos (1)	ni
E (6)	GEN TOB SXT (2)	ni
	CIP GEN TOB SXT (1)	ni
	CIP SXT (1)	ni
	CIP (1)	-
	Susceptível a todos antimicrobianos (1)	ni
F (2)	IMP MER AMS CAZ AMI PTZ FEP SXT (1)	-
	CIP GEN TOB SXT (1)	ni
G (2), H (2)	SXT (4)	ni
	SXT (1)	-
I (1)	IMP MER AMS CAZ CIP GEN TOB PTZ FEP SXT (1)	-
J (1)	Susceptibilidade a todos antimicrobianos (1)	ni
K (1)	Susceptibilidade a todos antimicrobianos (1)	ni
L (1)	Susceptibilidade a todos antimicrobianos (1)	-

^aAvaliados em teste de disco-difusão em ágar (CLSI 2009); ^bResistência somada à susceptibilidade intermediária; IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AMI: amicacina; PTZ: piperacilina/tazobactam; FEP: cefepime; SXT: sulfametoxazol/trimetropim. +: presente; -: ausente; ni: não investigado.

Entre as bactérias Gram-negativas, o gênero *Acinetobacter* tem sido considerado o segundo bacilo Gram-negativo não-fermentador (BGNNF) mais comumente envolvido em infecções associadas aos cuidados da saúde (FOURNIER & RICHET, 2006). Os principais fatores atribuídos à sua importância são a elevada incidência em muitos hospitais e a resistência a múltiplas drogas, ambos fatores relacionados à pressão seletiva exercida pelo uso intenso de antimicrobianos de amplo espectro (LI *et al.*, 2006). Com este contínuo aumento da resistência, a vigilância deste patógeno se tornou uma necessidade, devendo combinar esforços locais, nacionais e internacionais (CARVALHO *et al.*, 2009; NEMEC *et al.*, 2004). No HUCFF, desde 2001, *Acinetobacter* sp. se tornou o agente mais frequente de infecções associadas aos cuidados da saúde entre pacientes admitidos no CTI. Esta informação está registrada nos relatórios internos da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).

No presente estudo, o principal sítio de ocorrência de *Acinetobacter* spp. foi o trato respiratório inferior (63%) entre as amostras provenientes de pacientes colonizados. As amostras de infecção foram obtidas principalmente de sangue (37%), cateter (26,3%) e trato respiratório inferior (26%). Considerando-se pacientes infectados por *A. baumannii*, segundo dados de vigilância do programa MYSTIC sangue e cateter aparecem em primeiro lugar, com 20,8% das amostras, e o trato respiratório em segundo, com 17,1% (MENDES *et al.*, 2005). De fato, espécies de *Acinetobacter* têm sido descritas como agentes frequentes de bacteremias e infecções do trato respiratório (CHIANG *et al.*, 2008; KOULENTI *et al.*, 2009). Na rede RM/ANVISA, dentre os patógenos associados a infecção primária da corrente sanguínea em pacientes admitidos em CTI, *Acinetobacter* spp. correspondeu a 11%, sendo o quarto micro-organismo mais isolado, seguindo *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Pneumonia

nosocomial é a infecção mais frequente em CTI e varia entre 5 e 10 casos por 1.000 admissões hospitalares. Esta frequência aumenta de 6 a 20 vezes em pacientes submetidos à ventilação mecânica (CHASTRE & FAGON, 2002).

1. Identificação de *Acinetobacter* em espécies

Os métodos fenotípicos de identificação disponíveis apresentam muitas limitações devido à similaridade fenotípica dentro das unidades taxonômicas do gênero *Acinetobacter*. Na perspectiva clínica onde apenas sistemas fenotípicos são utilizados, as amostras de *Acinetobacter* spp. obtidas de espécimes clínicos são classificadas apenas entre as espécies do complexo ACB. Neste complexo são incluídas apenas três espécies relevantes clinicamente (*A. baumannii*, Gen. sp. 13TU e Gen. sp. 3), além de uma espécie ambiental (*A. calcoaceticus*) (DIJKSHOORN, NEMEC & SEIFERT, 2007). Assim, muitas espécies permanecem sem identificação, particularmente as assacarolíticas. Dentre estas se destacam a Gen. sp. 10 e Gen. sp. 11 (DORTET *et al.*, 2006; BERGOGNE-BEREZIN & TOWNER, 1996).

No presente estudo, foi possível a classificação final em espécies de 243 amostras. Dentre estas amostras, 166 (66,7%) foram *A. baumannii*, 74 (29,5%) Gen. sp. 13TU, duas (0,8%) Gen. sp. 10, uma (0,4%) Gen. sp. próxima à 13TU. As 6 amostras que não puderam ser identificadas em espécie podem ter sofrido mutações nos sítios de anelamento dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene *rpoB*, ou então não pertencem ao gênero *Acinetobacter*. Apesar destas amostras terem sido identificadas no gênero a partir de testes fenotípicos peculiares, somente o estudo das sequências de nucleotídeos de outros genes, tais como o 16S rRNA, poderá esclarecer a classificação final destas amostras. Estudos semelhantes realizados por Gundi e colaboradores (2009) observaram que duas amostras que apresentaram similaridade <98% entre a sequência parcial do gene *rpoB*

e aquelas depositadas no GenBank tiveram a identificação final na espécie *A. schindleri* por meio da análise da sequência do gene 16S r RNA.

A identificação genotípica de *Acinetobacter* spp. em estudos semelhantes demonstrou que, de fato, a espécie *A. baumannii* é a predominante entre amostras de origem clínica. Por exemplo, em um estudo de Gundi e colaboradores (2009), a caracterização de uma coleção de 99 amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. obtidas de 4 hospitais franceses revelou que *A. baumannii* correspondia a 52% do total. De forma semelhante, no estudo de Lee e colaboradores (2007), *A. baumannii* correspondeu a 61,2% das 232 amostras de *Acinetobacter* spp. analisadas obtidas de 2 hospitais coreanos. Já no estudo de Seifert e colaboradores (1993b), realizado apenas a partir dos testes fenotípicos descritos por Bouvet e Grimont (1986), em uma coleção de 584 amostras de *Acinetobacter* spp. obtidas de 420 pacientes em 12 hospitais diferentes na Alemanha, 72,9% foram incluídas na espécie *A. baumannii*.

A segunda espécie mais comum do presente estudo foi Gen. sp. 13TU (29,5%). Essa espécie foi a segunda mais frequente também nos estudos de Lee e colaboradores (2007) e de Lim e colaboradores (2007), com 25,8% das 232 amostras, e 15,5% das 58 amostras obtidas de hospitais coreanos, respectivamente.

No estudo de Gundi e colaboradores (2009), uma amostra de *Acinetobacter* sp. apenas foi identificada como Gen. sp. próxima à 13TU (1%). De forma semelhante, no presente estudo, a frequência de Gen. sp. próxima à 13TU foi de 0,4%. Curiosamente, a Gen. sp. 3 não foi encontrada no presente estudo, diferentemente dos estudos de Gundi e colaboradores (2009) e Seifert e colaboradores (1993b) que a indicaram como a segunda espécie mais frequente (27,5% e 9,5%, respectivamente) entre amostras clínicas. Todavia, ainda no estudo de Gundi e colaboradores (2009), 10% das amostras foram identificadas como *A. haemolyticus*, espécie não observada no presente estudo.

Algumas espécies de *Acinetobacter*, tais como *A. junii* e *A. johnsonii*, têm sido associadas esporadicamente à bacteremia (HUNG *et al.*, 2009;

SEIFERT *et al.*, 1993). Contudo, no presente estudo, apesar do isolamento de 14 amostras de sangue, estas espécies não foram observadas.

A maioria dos estudos realizados para identificação genotípica de *Acinetobacter* spp. utiliza a técnica ARDRA, entretanto, a grande desvantagem desta técnica é a necessidade de diversas cepas de referência para uma maior acurácia na interpretação dos resultados.

Assim, a correta classificação de *Acinetobacter* em espécie através de métodos genotípicos é necessária para a obtenção de respostas relacionadas ao significado clínico das genomoespécies na epidemiologia hospitalar.

2. Susceptibilidade aos antimicrobianos

No presente estudo, foram observados elevados percentuais de resistência aos antimicrobianos distribuídos em diferentes espécies do gênero *Acinetobacter*. Foram observadas desde amostras apresentando susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados (12% de 249) até amostras apresentando resistência a todos os antimicrobianos avaliados (9% de 249).

Os carbapenemas são antimicrobianos de amplo espectro indicados na terapêutica de infecções causadas por amostras de *Acinetobacter* spp. resistentes a múltiplas drogas. Com a emergência da resistência a estes antimicrobianos, o monitoramento da susceptibilidade a estas drogas tem sido recomendado (CARVALHO *et al.*, 2009). Desde o ano de 2006, a ocorrência de *Acinetobacter* spp. multirresistente (MR) é motivo de vigilância no HUCFF. No entanto, a definição de MR adotada pela CCIH daquele hospital tem sofrido alterações com o decorrer do tempo. A partir do ano de 2008, as amostras consideradas MR são aquelas resistentes a todos antimicrobianos testados ou susceptíveis apenas aos aminoglicosídeos. Estas definições podem ser consultadas no endereço eletrônico (www.hucff.ufrj.br/ccih/pdf/tc/.pdf). No presente estudo, 22 (9%) amostras resistentes a todos antimicrobianos seriam incluídas nesta definição de MR e

os respectivos pacientes deveriam ser investigados quanto à necessidade de implantação de medidas de precaução de contato.

No presente estudo, a taxa de resistência aos carbapenemas observada foi de 59% (entre os 102 pacientes incluídos no estudo). Esta taxa foi similar às observadas pela Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em serviços de saúde (RM/ANVISA), entre julho de 2006 a junho de 2007, que variou entre 47% e 60%. Esta resistência aos carbapenemas promoveu o reaparecimento do interesse em drogas “antigas”, como as polimixinas, como uma das únicas formas para o tratamento destas infecções.

Entretanto, elevados percentuais de resistência aos carbapenemas podem não ser a regra. Por exemplo, dados do Programa MYSTIC sobre a susceptibilidade antimicrobiana em sete CTIs de quatro grandes centros brasileiros (em Brasília, Florianópolis, Rio de Janeiro e São Paulo) evidenciaram resistência ao imipenem em apenas 10,4% das amostras de *A. baumannii* em 2002 (MENDES *et al.*, 2005). É possível, no entanto, que a resistência aos carbapenemas esteja mais elevada nestes centros nos dias atuais.

Dados dos Estados Unidos mostraram que a resistência ao imipenem em amostras de *A. baumannii* aumentou de 0%, em 1986, para 42%, em 2003, nas infecções em CTI (MCDONALD *et al.*, 2006). De acordo com os dados do programa SENTRY a resistência em *A. baumannii* é maior na América Latina do que nos Estados Unidos e Europa. Em 2001, a prevalência da resistência aos carbapenemas na América Latina em amostras de *A. baumannii* foi de 25%. Em 2005, as taxas de resistência aos carbapenemas em amostras de *A. baumannii* foi cerca de 40% em 12 hospitais da Colômbia (VILLEGAS *et al.*, 2007). No entanto, em hospitais norte-americanos, as taxas de resistência observadas entre as amostras de *Acinetobacter* spp. foram: para ciprofloxacina, 83,4%; para gentamicina, 69,3%; para cefepime, 56,6%; para ceftazidima, 40,3%; e para imipenem, 18,2% (PFALLER *et al.*, 2006).

No presente estudo, as amostras da espécie *A. baumannii* tiveram como característica a resistência a múltiplas drogas, sendo que a R/I aos carbapenemas (meropenem ou imipenem) foi observada em 135 (81%) amostras, e a susceptibilidade a todos antimicrobianos ou resistência a apenas um antimicrobiano, em apenas 10 (6%) amostras. Já entre as amostras de Gen. sp. 13TU, a R/I aos carbapenemas foi observada em apenas 7 (9%) das 74 amostras ($p < 0,001$), e a susceptibilidade a todos antimicrobianos testados ou resistência a apenas um antimicrobiano em 43 (58%) amostras ($p < 0,001$). Assim, o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos demonstrou que amostras de *A. baumannii* foram resistentes à maioria dos antimicrobianos testados, enquanto que amostras de Gen. sp. 13TU foram mais susceptíveis à maioria dos antimicrobianos. Deste modo, é possível que estas diferenças de susceptibilidade aos antimicrobianos resultem de características genéticas intrínsecas a cada espécie ou, então, são apenas influências da pressão seletiva de antimicrobianos.

Embora Spence e colaboradores (2002) tenham observado resistência a múltiplos antimicrobianos entre as amostras obtidas de infecção de Gen. sp. 13TU, Van dessel e colaboradores (2002) relataram que amostras desta genomoespécie apresentaram susceptibilidade a todos antimicrobianos em surtos de infecções associadas aos cuidados da saúde. Lin e colaboradores (2008) observaram que as amostras de *A. baumannii* eram resistentes à maioria dos antimicrobianos (ampicilina/sulbactam, aztreonam, imipenem, cefepime, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, meropenem) exceto ao imipenem, enquanto que as amostras de Gen. sp. 13TU eram susceptíveis à maioria dos antimicrobianos testados, especialmente ciprofloxacina e ampicilina/sulbactam.

Assim, é possível constatar que amostras de *Acinetobacter* spp. susceptíveis aos antimicrobianos também são capazes de causar surtos de difícil controle. Entretanto, devido às dificuldades de identificação adequada da espécie Gen. sp. 13TU na rotina laboratorial, a sua importância em infecções associadas aos cuidados da saúde pode estar sendo subestimada.

Mesmo quando estas amostras são susceptíveis a todos antimicrobianos, elas devem fazer parte da vigilância de infecção hospitalar.

A crescente prevalência de amostras de *A. baumannii* resistentes a múltiplas drogas reforça a necessidade de desenvolvimento de drogas alternativas para o tratamento de infecções causadas por este microorganismo. Contudo, a maioria dos estudos de resistência aos antimicrobianos não classifica *Acinetobacter* em espécies. Por isso, é possível que outras espécies devam ser incluídas, além de *A. baumannii*, nos sistemas de vigilância.

3. Detecção do gene *bla*_{OXA-23}

Carbapenemases pertencentes à classe D de Ambler emergiram em *A. baumannii* no mundo todo (LIVERMORE & WOODFORD, 2000). No presente estudo, a pesquisa do gene *bla*_{OXA-23}, que codifica a enzima do tipo OXA-23, foi escolhida devido aos relatos de estudos anteriores sobre a existência deste marcador genético em hospitais no Brasil (CARVALHO *et al.*, 2009; DALLA-COSTA *et al.*, 2003). Os primeiros casos de *A. baumannii* com resistência aos carbapenemas em amostras que carregam o gene *bla*_{OXA-23} foram relatados em Curitiba, em 1999. Essas observações foram publicadas 14 anos após o primeiro relato da presença do gene *bla*_{OXA-23} em uma amostra de *A. baumannii* de origem clínica na Escócia (PATON *et al.*, 1993). Genótipos de *A. baumannii* carreadores do gene *bla*_{OXA-23} têm causado surtos em hospitais em diferentes partes do mundo, tais como na França, Coreia do Sul e Polinésia. Por outro lado, amostras carreadoras do gene *bla*_{OXA-23} relacionadas a genótipos esporádicos já foram descritas na Austrália, China e Inglaterra (ZONG *et al.*, 2008).

O primeiro surto por amostras de *A. baumannii* carreadoras do gene *bla*_{OXA-23} ocorreu na Ásia, em 2003. Neste surto, foram detectadas 36 amostras resistentes ao imipenem relacionadas a um único genótipo (JEON *et al.*, 2005). Na Inglaterra, um estudo com 627 amostras de *A. baumannii* resistentes ao imipenem e a outros antimicrobianos permitiu a observação de

dois principais clones produtores da enzima OXA-23: Clone 1-OXA-23 e Clone 2-OXA-23 (COELHO *et al.*, 2006a).

No presente estudo, o gene *bla*_{OXA-23}^{similar} foi detectado em 89,3% (134/150) das amostras de *A. baumannii* com resistência aos carbapenemas ou à ceftazidima. O sequenciamento do produto de uma das amostras confirmou a presença do gene *bla*_{OXA-23}. Recentemente, um percentual semelhante (87,3%) de amostras de *A. baumannii* que carregavam o gene *bla*_{OXA-23} foi observado entre aquelas resistentes ao imipenem obtidas de oito diferentes hospitais do estado do Rio de Janeiro (CARVALHO *et al.*, 2009). No entanto, não se sabe se o genótipo detectado em Curitiba tem relação genética com aqueles observados no Rio de Janeiro e com os presentes no nosso estudo. A ausência de tipificação por meio de técnicas que utilizam sequenciamento impede a realização de comparações entre as características genotípicas destas linhagens.

O presente estudo é o primeiro que descreve a ocorrência do gene *bla*_{OXA-23}^{similar} em uma amostra de Gen. sp. 13TU.

A presença do gene *bla*_{OXA-23} pode estar relacionada ao elevado número de amostras resistentes aos carbapenemas observado no presente estudo. No entanto, a resistência aos carbapenemas também pode estar associada a outros mecanismos, tais como a produção de MBLA, já descrita em *A. baumannii* (POIREL & NORMAND, 2006). Além disso, as amostras positivas para o gene *bla*_{OXA-23}^{similar} observadas no presente estudo também podem ser portadoras de outros mecanismos de resistência, como a expressão em grande quantidade de bombas de efluxo, a alteração de porinas e a produção de outras β -lactamases.

A resistência para 3 (cefepime, ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetropim) dos 9 antimicrobianos testados foi significativamente mais elevada entre as amostras com resistência aos carbapenemas. Isso pode ter ocorrido devido à inserção do gene em amostras com background genético, ou em plasmídeo, já selecionado para determinantes de resistência. De fato, uma ilha de resistência (AbaR1) contendo 45 diferentes genes de resistência (que codificam para β -lactamases OXA-10, VEB-1, AmpC, diversas enzimas

modificadoras de aminoglicosídeos e bombas de efluxo) já foi descrita no genoma de uma cepa de *A. baumannii*, assim como foram encontrados genes de resistência fora desta ilha (β -lactamases classe ampC e o gene *bla*_{OXA-69}) (FOURNIER *et al.*, 2006).

4. Caracterização molecular das amostras de *Acinetobacter*

Para verificar a diversidade genotípica entre as amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas no HUCFF, as mesmas foram genotipificadas por meio da técnica de RAPD. Esta técnica se mostrou aplicável à tipificação de *Acinetobacter* spp. (KOELEMAN *et al.*, 1998; GRUNDMANN *et al.*, 1997). Em nosso estudo, todas as 249 amostras foram avaliadas, sendo que apenas cinco não foram tipificáveis. Para esta caracterização todas as amostras isoladas de um mesmo paciente foram estudadas.

Dentre as 166 amostras de *A. baumannii* do presente estudo, 163 foram classificadas em 29 diferentes genótipos, sendo três não tipificáveis. Dentre estes, houve o predomínio dos perfis A, B, D, E e G, que corresponderam a 23%, 21%, 19%, 20% e 17% das amostras, respectivamente. Estes resultados confirmam achados de outros estudos que demonstram a disseminação de genótipos predominantes, principalmente de *A. baumannii* resistentes a múltiplas drogas (TURTON *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2006a).

As 74 amostras de Gen. sp. 13TU do presente estudo foram classificadas em 12 diferentes genótipos. Dentre estes, houve o predomínio dos genótipos A, B, C, D e E que corresponderam a 40%, 23%, 16%, 11% e 10% das amostras, respectivamente. Estudos de Spence e colaboradores (2002), a partir de resultados de RAPD utilizando o oligonucleotídeo iniciador DAF-4, relataram a predominância de dois genótipos de Gen. sp. 13 TU, além de outros dois genótipos de *A. baumannii*, entre amostras clínicas de infecções associadas aos cuidados da saúde em hospitais do Reino Unido.

Um estudo descreveu a persistência e propagação de um único genótipo de *Gen. sp. 13TU* em um hospital universitário escocês a partir da técnica de PFGE (MCDONALD, AMYES & PATON, 1999). Van Dessel e colaboradores (2002) também descreveram um surto causado por amostras de *Gen. sp. 13TU*, neste caso, susceptíveis a todos antimicrobianos testados.

A observação de inúmeros genótipos de *A. baumannii* com características de resistência a múltiplas drogas e carreadores do gene *bla_{OXA-23}* evidencia a enorme dificuldade no controle de infecções por estes micro-organismos. Todavia, a técnica de RAPD foi utilizada apenas como rastreamento inicial. Assim, estudos adicionais serão necessários para a caracterização molecular das amostras pertencentes a esses genótipos, principalmente técnicas de sequenciamento que permitam determinar possíveis associações com linhagens clonais de *A. baumannii* descritas em diferentes partes do mundo.

Estudos têm demonstrado que pacientes infectados e/ou colonizados podem ser os reservatórios de *A. baumannii* resistentes a múltiplas drogas, e que a principal via de transmissão ocorre pelas mãos dos profissionais de saúde (VILLEGAS & HARTSTEIN, 2003). No entanto, estudos adicionais são necessários para verificar a possibilidade da disseminação de genótipos predominantes para outros hospitais, devido à transferência de pacientes entre hospitais, ou mesmo, através de membros da equipe de saúde que trabalham em diferentes hospitais.

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que:

1. Dentre as amostras de *Acinetobacter* spp. avaliadas, *A. baumannii* (66,7%) foi a espécie predominante e a segunda espécie foi Gen. sp. 13TU (29,5%). Outras espécies menos prevalentes foram Gen. sp. próxima a 13TU e Gen sp. 10 (< 1% cada uma).
2. A determinação da susceptibilidade a 11 antimicrobianos permitiu observar resistência a todos antimicrobianos testados em 9% das amostras. Elevadas frequências de resistência foram observadas para todos os antimicrobianos investigados. Considerando-se apenas uma amostra por cada paciente (critério de seleção: a amostra mais resistente), a resistência aos carbapenemas foi de 59%; as taxas para todos os outros antimicrobianos foram maiores do que 39%.
3. A presença do gene *bla*_{OXA-23}^{similar} foi observada em 85,3% das 158 amostras resistentes aos carbapenemas ou à ceftazidima, distribuídas em 17 genótipos de *A. baumannii* e em um genótipo de Gen. sp. 13TU. Este resultado indicou uma dispersão importante deste marcador de resistência no CTI do estudo.
4. Uma composição clonal restrita foi observada, sendo 66% das amostras de *A. baumannii* incluídas em apenas 5 dos 29 genótipos dessa espécie, e 84% das amostras de Gen. sp. 13TU incluídas em apenas 5 dos 12 genótipos dessa genomoespécie. Este achado indica uma vasta transmissão cruzada de amostras no ambiente do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTUAL, SERGIO G.; SEIFERT, H.; HIPPLER, C.; LUZON, M.A.D.; WISPLINGHOFF, H. & RODRÍGUEZ-VALERA, F. **Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii***. J. Clin. Microbiol., 43, 4382–4390, 2005.
- BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M. & STANIER, R. Y. **A Study of the Moraxella Group II. Oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*)**. J. Bacteriol., 95, 1520-1541, 1968.
- BECEIRO, A.; DOMINGUEZ, L.; RIBERA, A.; VILA, J.; MOLINA, F.; VILLANUEVA, R.; EIROS, J.M. & BOU G. **Molecular characterization of the gene encoding a new AmpC β -lactamase in a clinical strain of *Acinetobacter* genomic species 3**. Antimicrob. Agents Chemother., 48, 1374-1378, 2004.
- BERGOGNE-BEREZIN, E. & TOWNER, K.J. ***Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features**. Clin. Microbiol. Rev., 9, 148-165, 1996.
- BOU, G.; CERVERO, G.; DOMÍNGUEZ, M.A.; QUEREDA, C. & MARTÍNEZ-BELTRÁN, J.. **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., 6, 635-643, 2000.
- BOUVET, P. J. M. & GRIMONT P. A. D. **Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii***. Int. J. Syst. Bacteriol., 36, 228–240, 1986.
- BOUVET, P. J. M. & JEANJEAN, S. **Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter***. Res. Microbiol. 140, 291–299, 1989.
- BRISSE, S. ; MILATOVIC, D.; FLUIT, A.C.; KUSTERS, K.; TOELSTRA, A.; VERHOEF, J. & SCHMITZ, FRANZ-JOSEF. **Molecular surveillance of European quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. using automated ribotyping**. J. Clin. Microbiol., 38, 3636–3645, 2000.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A. & MEDEIROS A. A. **A functional classification scheme for beta-lactamases and Its Correlation with Molecular Structure**. Antimicrob. Agents Chemother, 39, 1211-1233, 1995.
- CARR, E.L.; KAMPFER, P.; PATEL, B.K.C.; GURTLER, V. & SEVIOUR R.J. **Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge**. Int. J. Syst. and Evol. Microb., 53, 953–963, 2003.
- CARVALHO, K.R.; CARVALHO-ASSEF, A.P.D; PEIRANO, G.; SANTOS, L.C.G.; PEREIRA, M.J.F. & ASENSI, M.D. **Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil**. Int. J. Antimicrob. Agents, *In Press*, 2009.
- CHANG, H.C.; WEI, Y.F.; DIJKSHOORN, L.; VANEECHOUTTE, M.; TANG, C.T. & CHANG, T.C. **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., 43, 1632-1639, 2005.

CHASTRE, J. & FAGON, J.Y. **Ventilator-associated pneumonia.** *Am J Respir Crit Care Med*, 165,867–903, 2002.

CHIANG, D.; WANG, C.; KUO, H.; CHEN, H.; CHEN, T.; WANG, F.; CHO, W. & LIU C. **Risk factors for mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection with genotypic species identification.** *J. Microbiol. Immunol. Inf.*, 41, 397-402, 2008.

CHU, Y.; AFZAL-SHAH, M.; HOUANG, E.T.S; PALEPOU, M.I.; LYON, D.J.; WOODFORD, N. & LIVERMORE D.M. **IMP-4, a Novel Metallo- β -lactamase from Nosocomial *Acinetobacter* spp. Collected in Hong Kong between 1994 and 1998.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 710-714, 2001.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Nineteenth Informational Supplement.** Document M100-S19. CLSI, Wayne Pa, 2009.

COELHO, J.; TURTON, J. F.; KAUFMANN, M. E.; GLOVER, J.; WOODFORD, N.; WARNER, M.; PAPELOU, M.-F.; PIKE, R.; PITT, T. L.; PATEL, B. C.; LIVERMORE, D. M. **Occurrence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clones at Multiple Hospitals in London and Southeast England.** *J. Clin. Microbiol.*, 44, 3623-3627, 2006a.

COELHO, J.; WOODFORD, N.; M. AFZAL-SHAH & LIVERMORE, D. **Occurrence of OXA-58-simile carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 756–758, 2006b.

CORVEC S.; CAROFF A.; ESPAZE, E.; GIRAUDEAU, C.; DRUGEON H. & REYNAUD A. **AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains.** *J. Antimicrob. Chemother.*, 52, 629–635, 2003.

D'AREZZO, S.; CAPONE, A.; PETROSILLO, N. & VISCA, P. **Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European clonal types I and II in Rome (Italy).** *Clin. Microbiol. Infec.*, 15(4), 347-357, 2009.

DALLA-COSTA, L.M.; COELHO, J.M.; SOUZA, H.A.P.H.M.; CASTRO, M.E.S.; STIER, C.J.N.; BRAGAGNOLO, K.L.; REA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S.R.; LIVERMORE, D.M. & WOODFORD N. **Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, 3403-3406, 2003.

DAMIER-PIOLLE, L.; MAGNET, S.; BRE'MONT, S.; LAMBERT, T. & COURVALIN P. **AdelJK, a Resistance-Nodulation-Cell Division Pump Effluxing Multiple Antibiotics in *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52, 557–562, 2008.

DA SILVA, G.J.; QUINTEIRA, S.; BE'RTOLO, E.; SOUSA, J.C.; GALLEGU, L.; DUARTE, A. & PEIXE, L. **Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula.** *J. Antimicrob. Chemother.*, 54, 255–258, 2004.

DEAN, A.G. **Epi Info and Epi Map: Current status and plans for Epi Info 2000.** *J. Pub. Health Management and Practice*, 5, 54-57, 1994.

DESHPANDE, L.M.; FRITSCH, T.R. & JONES, R.N. **Molecular epidemiology of selected multidrug-resistant bacteria: a molecular global report from the Sentry Antimicrobial Surveillance Program.** *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 49, 231-236, 2004.

DI CELLO, F.; PEPI, M.; BALDI, F. & FANI, R. **Molecular characterization of an n-alkane-**

degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter Acinetobacter*. Res. Microbiol., 148, 237-249, 1997.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A. & SEIFERT H. **An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii***. Nature Reviews Microbiol., 5, 939-951, 2007.

DIJKSHOORN, L., AUCKEN, H., GERNER-SMIDT, P., JANSSEN, P., KAUFMANN, M.E., GARAIZAR, J., URSING, J., AND PITT, T.L. **Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods**. J. Clin. Microbiol. 34, 1519–1525, 1996.

DIJKSHOORN, L., R. VAN DALEN, A. VAN OUYEN, D. BIJL, I. TJERNBERG, M. F. MICHEL, AND A. M. HORREVORTS. **Endemic *Acinetobacter* in intensive care units: epidemiology and clinical impact**. J. Clin. Pathol. 46, 533–536, 1993.

DONALD, H. M.; SCAIFE, W.; AMYES, S. G. & YOUNG, H. K. **Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92**. Antimicrob. Agents Chemother., 44, 96–199, 2000.

DORTET, L.; LEGRAND, P.; SOUSSY, C. & CATTOIR V. **Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens**. J. Clin. Microbiol., 44, 4471-4478, 2006.

DRANCOURT, M. & D. RAOULT. **Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository**. J. Clin. Microbiol, 43, 4311–4315, 2005.

ENDIMIANI, ANDREA; LUZZARO, F.; MIGLIAVACCA, R.; MANTENGOLI, E.; HUJER, A.M.; HUJER, K.M.; PAGANI, L.; BONOMO, R.A.; ROSSOLINI, G.M. & TONIOLO A. **Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-Spectrum β -lactamase**. Antimicrob. Agents Chemother., 51, 2211–2214, 2007.

FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap**. Evolution. 39, 783-791, 1985.

FOURNIER P.E. & RICHEL H. **The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities**. Clin. Infect. Dis., 42, 692-9, 2006.

FOURNIER P.E.; VALLENET, D.; BARBE, V.; AUDIC, S.; OGATA, H.; POIREL, L.; RICHEL, H.; ROBERT, C.; MANGENOT, S.; ABERGEL, C.; NORDMANN, P.; WEISSENBACH, J.; RAOULT, D. & CLAVERIE J.M. **Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii***. PLoS Genet., 2, 62-72, 2006.

FRITSCHÉ, T. R.; SADER, H. S.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. & JONES, R. N.. **Emerging metallo- β -lactamase mediated resistances: a summary report from the worldwide Sentry Antimicrobial Surveillance Program**. CID 2005, 41 (Suppl 4).

GALES, A.C.; TOGNIM, M.C.B.; REIS, A.O.; JONES, R.N. & SADER, H.S. **Emergence of an IMP-simile metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital**. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 45, 77-79, 2003.

GARNACHO-MONTERO, J. ; ORTIZ-LEYBA , C. ; JIME'NEZ-JIME'NEZ, F.J. ; BARRERO-LMODO'VAR, A.E. ; GARCÝ'A-GARMENDIA, J.L. ; BERNABEU-WITTELI, M.; GALLEGOLARA, S.L. & MADRAZO-OSUNA J. **Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: A**

comparison with imipenem-susceptible VAP. Clin. Infect. Dis., 36, 1111–8, 2003.

GERNER-SMIDT, P., TJERNBERG, I. & URSING, J.. **Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species.** J. Clin. Microbiol., 29, 277–282, 1991.

GERNER-SMIDT, P. & TJERNBERG, I. ***Acinetobacter* in Denmark. II Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex.** APMIS, 101, 826-832, 1993.

GRIFFITH, M.E.; CEREMUGA, J.M.; ELLIS, M.W.; GUYMON, C.H.; HOSPENTHAL, D.R. & MURRAY, C.K. ***Acinetobacter* skin colonization of US Army soldiers.** Infect. Control and Hospital Epidemiology, 27, 659-661, 2006.

GRUNDMANN, H. J.; TOWNER, K.J.; DIJKSHOORN, L.; GERNER-SMIDT, P.; MAHER, M.; SEIFERT, H. & VANEECHOUTTE M. **Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp..** J. Clin. Microbiol., 35, 3071-3077, 1997.

GUNDI, V.A.K.B; DIJKSHOORN, L.; BURIGNAT, S.; RAOULT, D. & LA SCOLA, B. **Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species.** Microbiol., 155, 2333, 2009.

HALL, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucl. Acids. Symp. Ser., 41,95-98, 1999.

HENDRICKX, L.; HAUSNER, M. & WUERTZ S. **Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* sp. strain BD413 biofilms.** Applied and Environmental microbiology, 69, 1721–1727, 2003.

HIGGINS, P. G.; WISPLINGHOFF, H.; STEFANIK, D. & SEIFERT H. **Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*.** J. Antimicrob. Chemother.54, 821–823, 2004.

HUANG, Z.M.; MAO, P.H.; CHEN, Y. & WU, L. **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, 25, 425-427, 2004.

HUJER, K. M.; HUJER, A.M.; HULTEN, E.A.; BAJAKSOUZIAN, S. ; ADAMS, J.M.; DONSKEY, C.J.; ECKER, D.J.; MASSIRE, C.; ESHOO, M.W.; SAMPATH, R.; THOMSON, J.M.; RATHER, P.N.; CRAFT, D.W.; FISHBAIN, J.T; EWELL, A.J.; JACOBS, M.R.; PATERSON, D.L. & BONOMO R.A. **Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center.** Antimicrob. Agents Chemother., 50, 4114–412, 2006.

HUJER, K.M.; HAMZA, N.S.; HUJER, A.M.; PEREZ, F.; HELFAND, M.S.; BETHEL, C.R.; THOMSON, J.M.; ANDERSON, V.E.; BARLOW, M.; RICE, L.B.; TENOVER, F.C. & BONOMO R.A. **Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 β -lactamase: Defining a unique family of class C enzymes.** Antimicrob. Agents Chemother., 49, 2941–2948, 2005.

HUNG, Y.; LEE, Y.; HUANG, L.; CHEN, T.; YU, K.; FUNG, C.; CHO, W. & LIU C. **Clinical characteristics of patients with *Acinetobacter junii* infection.** J. Microbiol Immunol Infect, 42, 47-53, 2009.

IBRAHIM, A.; GERNER-SMIDT, P. & LIESACK W. **Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis.** Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 837-841, 1997.

IKONOMIDIS, A.; NTOKOU, E.; MANIATIS, A. N.; TSAKRIS, A. & POURNARAS S. **Hidden VIM-1 metallo- β -lactamase phenotypes among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates.** J. Clin. Microbiol., 46, 346-249, 2008.

JANSSEN, P.; MAQUELIN, K.; COOPMAN, R.; TJERNBERG, I.; BOUVET, P.; KERSTERS, K.; DIJKSHOORN, L. **Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting.** Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 1179-1187, 1997.

JEON, B. C.; JEONG, S.H.; BAE, I.K.; KWON, S.B.; LEE, K.; YOUNG, D.; LEE, J.H.; .SONG, J.S. & LEE S.H. **Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea.** J. Clin. Microbiol., 43, 2241–2245, 2005.

JOLY-GUILLOU. **Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*.** Clinical Microbiology and Infection, 11, 868-873, 2005.

KILIC, A; LI, H.; MELLMANN, A.; BASUSTAOGU, A.C.; KUL, M.; SENSES, Z.; AYDOGAN, H.; STRATTON, C.W.; HARMSSEN, D. & TANG, Y.W. ***Acinetobacter septicus* sp. nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit.** J. Clin. Microbiol., 46, 902-908, 2008.

KIM, D.; BAIK, K.S.; KIM, M.S.; PARK, S.C.; KIM, S.S.; RHEE, M.S.; KWAK, Y.S. & SEONG, C.N. **List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59, 1555-1556, 2009.

KIM, D.; BAIK, K.S.; KIM, M.S.; PARK, S.C.; KIM, S.S.; RHEE, M.S.; KWAK, Y.S. & SEONG, C.N. ***Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil.** J. Microbiol., 46, 396-401, 2008.

KIMURA, M. **A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.** J. Mol. Evol. 16, 111-120, 1980.

KOELEMAN, J.G.M.; STOOFF, J.; BIESMANS, D.J.; SAVELKOU, P.H.M. & VANDENBROUCKE-GRAULS C.M.J.E. **Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*.** J. Clin. Microbiol., 36, 2522–2529, 1998.

KONEMAN E.W.; ALLEN S.D.; JANDA W.N.; PROCOP, G.W.; SCHRECKENBERGER, P.C. & WOODS G.L. **Koneman's color atlas and text book of diagnostic microbiology.** 6th ed. New York: Lippincot Williams & Wilkins. 2006. Cap .07.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I. & KAMPF, G. **How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review.** BMC Infectious Diseases, 6, 130, 2006.

KRANIOTAKI, E.; MANGANELLI, R.; PLATSOUKA, E.; GROSSATO, A.; PANIARA, O. & PAL` G. **Molecular investigation of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, with characterisation of class 1 integrons.** Int. J. Antimicrob. Agents, 28, 193–199, 2006.

- KRAWCZYK, B.; LEWANDOWSKI, K. & KUR, J. **Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the recA sequences.** Mol. Cell Probes, 16, 1-11, 2002.
- KOULENTI, D.; LISBOA, T.; BRUN-BUISSON, C.; KRUEGER, W.; MACOR, A.; SOLE-VIOLAN, J.; DIAZ, E.; TOPELI, A.; DEWAELE, J.; CARNEIRO, A.; MARTIN-LOECHES, I.; ARMAGANIDIS, A. & RELLO, J. **Spectrum of practice in the diagnosis of nosocomial pneumonia in patients requiring mechanical ventilation in European intensive care units.** Crit. Care Med., 37, 2009.
- KUO, L.; TENG, L.; YU, C.; HO, S. & HSUEH, P. **Dissemination of a clone of unusual phenotype of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* at a University Hospital in Taiwan.** J. Clin. Microbiol., 42, 1759–1763, 2004.
- LA SCOLA, B.; GUNDI, V.A.K.B; KHAMIS, A. & RAOULT D.. **Sequencing of the rpoB gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species.** J. Clin. Microbiol., 44, 827–32, 2006.
- LAUTROP, H. **Genus IV. *Acinetobacter* Brisou and Prévot 1954.** In R. E. Buchanan and N. E. Gibbons. Bergey's manual of determinative bacteriology. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 9th, 73, 1994.
- LEE, J.H.; CHOI, C.H.; KANG, H. Y.; LEE, J. Y.; KIM, J.; LEE, Y. C.; SEOL, S. Y.; CHO, D. T.; KIM, K. W.; SONG, D. Y. & LEE, J.C. **Differences in phenotypic and genotypic traits against antimicrobial agents between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU.** J. Antimicrob. Chemother., 59, 633–639, 2007.
- LEE, K.; YUM, J.H.; YONG, D.; LEE, H. M.; KIM, H. D.; DOCQUIER, J; ROSSOLINI, G.M. & CHONG, Y. **Novel acquired metallo- β -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea.** Antimicrob. Agents Chemother., 49, 4485-4491, 2005.
- LI, J; NATION, R.L. & TURNIDGE J.D. **Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections.** Lancet Infect. Dis., 6, 589-601, 2006.
- LIM, Y.M.; SHIM, K.S. & KIM, J. **Distinct antimicrobial resistance pattern and harboring antimicrobial resistance genes according to the genomic species of *Acinetobacter* isolates.** J. Clin. Microbiol., 45, 902-905, 2007.
- LIN, Y.C.; SHENG, W. H. ; CHANG, S. C.; WANG, J. T.; CHEN, Y. C.; WU, R.J; HSIA, K.C & LI, S.Y. **Application of a Microsphere-Based Array for Rapid Identification of *Acinetobacter* spp. with Distinct Antimicrobial Susceptibilities.** J. Clin. Microbiol., 46, 612–617, 2008.
- LIVERMORE, D. M. & WOODFORD, N. **Carbapenemases: a problem in waiting?** Curr. Op. in Microbiol., 3, 489-495, 2000.
- LORENZ, M.G. & WACKERNAGEL, W. **Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment.** Microbiol. Rev., 58, 563–602, 1994.
- 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., 45, 3375–80, 2001.
- MARCHAND, I.; DAMIER-PIOLLE, L.; COURVALIN, P. & LAMBERT, T. **Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system.** Antimicrob. Agents Chemother., 48, 3298–3304, 2004.

MCDONALD, C.L. **Trends in antimicrobial resistance in health care-associated pathogens and effect on treatment.** Clin. Infect. Dis., 42, S65–71, 2006.

MCDONALD, A.; AMYES, S.G. & PATON, R. **The persistence and clonal spread of a single strain of *Acinetobacter* 13TU in a large Scottish teaching hospital.** J. Chemother., 11, 338-44, 1999.

MENDES, C.; OPLUSTIL, C.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; KIFFER C. **Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002.** Braz. J. Infect. Dis, 9, 44-51, 2005.

METZGAR, D.; BACHER, J.M.; PEZO, V.; READER, J.; DORING, V.; SCHIMMEL, V.; MARLIERE, P. & CRECY-LAGARD V. ***Acinetobacter* sp. ADP1: an ideal model organism for genetic analysis and genome engineering.** Nucleic Acids Research., 32, 5780-5790, 2004.

MUNOZ-PRICE, L. S. & WEINSTEIN, R. A. ***Acinetobacter* Infection.** N. Engl. J. Med., 358, 1271-81, 2008.

NAAS, T.; BOGAERTS, P.; BAURAING, C.; DEGHELDRE, Y.; GLUPCZYNSKI, Y. & NORDMANN, P. **Emergence of PER and VEB extended-spectrum b-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium.** J. Antimicrob. Chemother., 58, 178–182, 2006.

NAGANO, N.; NAGANO, Y.; CORDEVANT C.; SHIBATA, N. & ARAKAWA Y. **Nosocomial transmission of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward.** J. Clin. Microbiol., 42, 3978–3984, 2004.

NAIEMI, N.A.; DUIM, B.; SAVELKOUL, P.H.M.; SPANJAARD, L.; JONGE, E.; BART, A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M. & DE JONG M.D. **Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: Implications for Hospital Epidemiology.** J. Clin. Microbiol., 43, 4862–4864, 2005.

NEMEC, A.; MUSILEK, M.; MAIXNEROVA, M.; BAERE, T.; VAN DER REIJDEN, T. J. K.; VANEECHOUTTE, M. & DIJKSHOORN, L. ***Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans.** Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol., 59, 118–124, 2009.

NEMEC, A.; MUSILEK, M.; VANEECHOUTTE, M.; FALSEN, A & DIJKSHOORN, L.. **Lack of evidence for '*Acinetobacter septicus*' as a species different from *Acinetobacter ursingii* ?** J. Clin. Microbiol. 46,2826-2827, 2008.

NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L. & VAN DER REIJDEN, T.J.K. **Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic.** J. Clin. Microbiol., 53, 147–153, 2004.

NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L.; CLEEWERCK, I.; DE BAERE, T.; JANSSENS, D.; VAN DER REIJDEN, T. J.; JEZEK, P. & VANEECHOUTTE, M. ***Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53, 1563-1567, 2003.

NEMEC, A.; DE BAERE, T.; TJERNBERG, I.; VANEECHOUTTE, M.; VAN DER REIJDEN, T.J.K. & DIJKSHOORN, L. ***Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 1891-1899, 2001.

NISHIMURA, Y.; INOT, I. & IZUKA, H. ***Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil.** Int. J. Syst. Bacteriol., 38, 209-211, 1988.

PATON, R., MILES, R. S. HOOD, J. & AMYES, S. G. B.. **ARI-1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*.** Int. J. Antimicrob. Agents, 2, 81–88, 1993.

PELEG A. Y.; SEIFERT, H. & PATERSON, D.L. ***Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen.** Clin. Microbiol. Reviews, 21, 538-582, 2008.

PEREZ, F.; HUJER, A.M.; HUJER, K.M.; DECKER, B.K., RATHER, P.N. & BONOMO R.A. **Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** Antimicrob. Agents Chemother., 51, 3471-3484, 2006.

PFALLER, M.A.; SADER, H. S.; FRITSCH, T. R. & JONES, R.N. **Antimicrobial activity of cefepime tested against ceftazidime-resistant gram-negative clinical strains from North American hospitals: report from the Sentry Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004).** Diag Microbiol Inf Dis, 56, 63-68, 2006.

POIREL, L.; FIGUEIREDO, S.; CATTOIR, V.; CARATTOLI, A. & NORDMANN, N. ***Acinetobacter radioresistens* as a Silent Source of Carbapenem Resistance for *Acinetobacter* spp.** Antimicrob. Agents Chemother., 52, 1252–1256, 2008.

POIREL, L.; CORVEC, S.; RAPOPORT, M.; MUGNIER, P.; PETRONI, A.; PASTERAN, F.; FACCONI, D.; GALAS, M.; DRUGEON, H.; CATTOIR, V. & NORDMANN P. **Identification of the novel narrow-spectrum β -lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina.** Antimicrob. Agents Chemother., 51, 2179–2184, 2007.

POIREL, L. & NORMAND P. **Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology.** Clin. Microbiol. Infect., 12, 826–836, 2006.

POIREL, L.; MARQUE, S.; HE´RITIER, C.; SEGONDS, C.; CHABANON, G. & NORDMANN P. **OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*.** Antimicrob. Agents Chemother., 49, 202–208, 2005.

POIREL, L.; MENUTEAU, O.; AGOLI, N.; CATTOEN, C. & NORDMANN P. **Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French Hospital.** J. Clin. Microbiol., 41, 3542-3547, 2003.

RM/ANVISA. Acessado em junho de 2009. Publicado em http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlerede_rm/index.htm

ROSSAU, R.; LANDSCHOOT, A.V.; GILLIS, M. & LEY, J. **Taxonomy of moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms.** Int. J. Syst. Bact., 41, 310-319, 1991.

SAITOU, N. & NEI, M. **The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.** Mol. Biol. Evol. 4, 406-425, 1987.

SEIFERT, H., A. STRATE, A. SCHULZE, AND G. PULVERER. **Vascular catheter related bloodstream infection due to *Acinetobacter johnsonii* (formerly *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Iwoffii*): report of 13 cases.** Clin. Infect. Dis. 17, 632–636, 1993.

SEIFERT, H.; BAGINSKI, R.; SCHULZE, A. & PULVERER, G. **The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials.** Zentralbl Bakteri., 279, 544-52, 1993b.

SHELBURNE, S.A.; SINGH, K.V.; WHITE JR., A.C.; BYRNE, L.; CARMER, A.; AUSTIN, C.; GRAVISS, E.; STAGER, C.; MURRAY, B.E. & ATMAR, R.L. **Sequential Outbreaks of Infections by Distinct *Acinetobacter baumannii* Strains in a Public Teaching Hospital in Houston, Texas.** J. Clin. Microbiol., 46, 198-205, 2008.

SILVA, G.J.; CORREIA, M.; VITAL, C.; RIBEIRO, G.; SOUSA, J.C.; LEITÃO, R.; PEIXE, L. & DUARTE, A. **Molecular characterization of blaIMP_5, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal.** FEMS Microbiol. Letters, 215, 33-39, 2002.

SIROY, A. MOLLE, V.; LEMAITRE-GUILLIER, C.; VALLENET, D.; PESTEL-CARON, M.; COZZONE, A.J.; JOUENNE, T. & DE´ E. **Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*.** Antimicrob. Agents Chemother., 49, 4876-4883, 2005.

SPENCE, R.P.; TOWNER, K.J.; HENWOOD, C.J.; JAMES, D.; WOODFORD, N. & LIVERMORE, D.M. **Population structure and antibiotic resistance of *Acinetobacter* DNA group 2 and 13TU isolates from hospitals in the UK.** J. Med. Microbiol., 51, 1107-1112, 2002.

SUNENSHINE, R.H.; WRIGHT, M.O.; MARAGAKIS, L.L.; HARRIS, A.D.; SONG, X.; HEBDEN, J. COSGROVE, S.E.; ANDERSON, A.; CARNELL, J.; JERNIGAN, D.B.; KLEINBAUM, D.G.; PERL, T.M.; STANDIFORD, H.C. & SRINIVASAN A. **Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization.** CDC, 13, 97-103, 2007.

TAMURA, K; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. **MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.** Mol. Biol. Evol. 24, 1596-1599, 2007.

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

TOGNIM, M. C. B.; GALES, A.C.; PENTEADO, A.P.; SILBERT, S. & SADER, H.S. **Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a brazilian teaching hospital.** Infection control and hospital epidemiology, 27, 742-747, 2006.

TOMARAS, A.P.; DORSEY, C.W.; EDELMANN, R.E. & ACTIS L.A.. **Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system.** Microbiology, 149, 3473-3484, 2003.

TURTON, J. F.; M.E. WARD, N. WOODFORD, M. E. KAUFMANN, R. PIKE, D. M. LIVERMORE & T. L. PITT. **The role of ISAb1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*.** FEMS Microbiol. Lett., 258, 72-77, 2006.

TURTON, J.F.; KAUFMANN, M.E.; COELHO, J.M.; DIJKSHOORN, L.; VAN DER REIJDEN, T. & PITT, Y.L. **A prevalent multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England.** J. Hosp. Infect., 58, 170-179, 2004.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P.T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N.K.; FUSSING, V.; GREEN, J.; FEIL, E; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE S. &

STRUELENS M. **Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology.** Clin. Microbiol. Infect. Dis., 13, 1–46, 2007.

VAN DESSEL, H.; DIJKSHOORN, L.; VAN DER REIJDEN, T.; BAKKER, N.; PAAUW, A.; VAN DEN BROEK, P.; VERHOEF, J. & SYLVAIN B. **Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals.** Research in Microbiology, 155, 105-112, 2004.

VAN DESSEL, H; KAMP-HOPMANS, T.E.; FLUIT, A.C.; BRISSE, S.; DE SMET, A.M.; DIJKSHOORN, L.; TROELSTRA, A.; VERHOEF, J. & MASCINI, E.M. **Outbreak of a susceptible strain of *Acinetobacter* species 13 (sensu Tjenberg and Ursing) in adult neurosurgical intensive care unit.** J. Hosp. Infect., 51, 89-95, 2002.

VANEECHOUTTE, M.; NEMEC, A.; MUSÍLEK, M.; VAN DER REIJDEN, T.J.K.; VAN DEN BARSELAAR, M.; TJERNBERG, I.; CALAME, W.; FANI, R.; DE BAERE, T. & DIJKSHOORN, L. **Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello *et al.* 1997 sp. nov.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59, 1376-1381, 2009.

VANEECHOUTTE, M.; BAERE, T.; NEMEC, A.; MUSILÉK, M.; REIJDEN, T.N.J.K. & DIJKSHOORN, L. **Reclassification of *Acinetobacter grimontii* Carr *et al.* 2003 as a later synonym of *Acinetobacter junii* Bouvet and Grimont 1986.** Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol., 58, 937–940, 2008.

VANEECHOUTTE, M.; YOUNG, D.M.; ORNSTON, L.N.; BAERE, T.; NEMEC, A.; REIJDEN, T.N.J.K.; CARR, E.; TJERNBERG, I. & DIJKSHOORN, L. **Naturally transformable *Acinetobacter* sp. strain ADP1 belongs to the newly described species *Acinetobacter baylyi*.** Applied and Environmental Microbiology, 92, 932-936, 2006.

VANEECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L.; TJERNBERG, I.; ELAICHOUNI, A.; DE VOS, P.; CLAEYS, G. & VERSCHRAEGEN G. **Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis.** J. Clin. Microbiol., 33, 11–15, 1995.

VILLEGAS, M.V.; KATTAN, J.N.; CORREA, A.; LOLANS, K.; GUZMAN, A.M.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. ; QUINN, J. P. & the Colombian Nosocomial Bacterial Resistance Study Group. **Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in colombian hospitals.** Antimicrob Agents Chemother, 51, 2001-2004, 2007.

VILLEGAS, M. V. & HARTSTEIN, ALAN I. ***Acinetobacter* outbreaks, 1977–2000.** Infect Control Hosp. Epidemiol., 24, 284-95, 2003.

WALSH, T.R. **The emergence and implications of metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria.** Clin. Microbiol. Inf., 11, 2-9, 2005.

WISPLINGHOFF, H.; EDMOND, M.B.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; WENZEL, R.P. & SEIFERT, H. **Nosocomial Bloodstream Infections Caused by *Acinetobacter* Species in United States Hospitals: Clinical Features, Molecular Epidemiology, and Antimicrobial Susceptibility.** Clin. Infect. Dis., 31, 690–7, 2000.

WISPLINGHOFF, H.; HIPPLER, C.; BARTUAL, S.G.; HAEFS, C.; STEFANIK, D.; HIGGINS, P.G. & SEIFERT, H. **Molecular epidemiology of clinical *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU isolates using a multilocus sequencing typing scheme.** Clin. Microbiol. Infect., 14, 708–715, 2008.

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

ZONG, Z.; LU, X.; VALENZUELA, J.K.; PARTRIDGE, S.R. & IREDELL J.. **An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase in western China.** Inter. J. Antimicrob. Agents, 31, 50-54, 2008.

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](#)