

**ADRYELLA DE PAULA FERREIRA LUZ**

*Acinetobacter* spp resistente a antimicrobianos carbapenêmicos  
isolados de Infecções Hospitalares de Corrente Sanguínea: Estudo  
do Projeto SCOPE Brasil

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo**  
**2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ADRYELLA DE PAULA FERREIRA LUZ**

*Acinetobacter* spp resistente a antimicrobianos carbapenêmicos  
isolados de Infecções Hospitalares de Corrente Sanguínea: Estudo  
do Projeto SCOPE Brasil

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Campos  
Pignatari

**São Paulo**  
**2010**

LUZ, Adryella

***Acinetobacter* spp. resistente a antimicrobianos carbapenêmicos isolados de Infecções Hospitalares de Corrente Sanguínea: Estudo do Projeto SCOPE Brasil** / Adryella de Paula Ferreira Luz - São Paulo, 2010.

xiv, 96 p

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias

**Título em inglês:** Carbapenem resistant *Acinetobacter* spp isolated from nosocomial bloodstream infections: report from the brazilian SCOPE Project

1. *Acinetobacter* spp. 2. carbapenêmicos 3. biologia molecular

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA**

**Chefe do Departamento:**

Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

**Coordenador do Curso de Pós-graduação:**

Prof. Dr. Ricardo Sobieh Diaz

**São Paulo**  
**2010**

**ADRYELLA DE PAULA FERREIRA LUZ**

*Acinetobacter* spp resistente a carbapenêmicos isolados de  
Infecções Hospitalares de Corrente Sanguínea: Estudo do  
Projeto SCOPE Brasil

**BANCA EXAMINADORA:**

**Titular:** Dr. Carlos Alberto Pires Pereira

**Titular:** Prof. Dr. Antonio Carlos Nicodemo

**Titular:** Profa. Beatriz Ernestina Cabilio Guth

**Suplente:** Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

*Aos meus pais, por todo o incentivo durante toda a minha vida, sempre acreditando na minha capacidade. Tenham certeza que vocês são os responsáveis pela pessoa que eu sou. Muito obrigada por todo o apoio, essa conquista também pertence a vocês!!!! Amo muito vocês!!!!*

*Ao meu grande amor Marcelo, por tudo o que você fez e faz por mim. Tudo o que eu disser ainda será pouco para agradecer seu apoio, dedicação, paciência, companheirismo e sabedoria. Você é o grande responsável por essa conquista. Muito obrigada por acreditar em mim!!!!*

*Eu sempre vou te amar, por toda minha vida eu vou te amar...*

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Antonio Carlos Campos Pignatari, pela oportunidade concedida em voltar ao LEMC como sua aluna e acreditar na minha capacidade na realização deste trabalho e por toda a disponibilidade e paciência. Sou muito orgulhosa em ser sua aluna, e muito feliz em poder compartilhar seus ensinamentos como Professor, Médico, e acima de tudo, ser humano.

A Dra. Antonia Maria de Oliveira Machado, minha querida Dra. Toninha, por ter me acolhido no IDIPA Lab e fazer com que eu crescesse profissionalmente. Obrigada por todas as oportunidades de aprendizado profissional e principalmente pessoal.

As minhas queridas amigas Agda, Mirella e Renata, com quem tive o grande prazer de conviver durante cinco anos no nosso tão querido IDIPA Lab, e onde aprendi muito do que sei hoje de Microbiologia. Realmente esses anos serão inesquecíveis, principalmente por nossa alegre convivência.

A minha amiga Mariana Castanheira, por sempre acreditar que eu deveria fazer mestrado, e por me incentivar a isso. Mari, mesmo de longe sei que você torce por mim, e eu aqui por você.

A Dra. Ana Cristina Gales, por todo ensinamento e oportunidade em fazer parte da equipe do laboratório Alerta. Seus ensinamentos sempre foram muito valiosos e contribuíram muito na realização desse trabalho. Obrigada por estar sempre disponível a ajudar.

A minha querida companheira de mestrado Loren Paschoal, por sua amizade sincera e verdadeira, e por ter me dado apoio em tantos momentos difíceis. Sua amizade fez com que esse caminho tenha ficado mais leve. Sucesso, você merece!

A minha amiga Andrea Pereira por sempre ter me apoiado em decisões importantes na minha vida, principalmente em voltar a estudar. Você foi muito importante na minha volta ao LEMC.

A amiga Rosana Capecce, pelo incentivo e apoio para minha volta ao LEMC, e por sempre ter sido compreensível comigo. Obrigada pelo carinho, amizade e disposição em sempre me ouvir e ajudar.

A Jussimara Monteiro, pelo apoio e incentivo na realização do meu Projeto, e por dividir seu vasto conhecimento.

Ao Rodrigo Cayô pela amizade, apoio, incentivo, e broncas. Aprendi muito com você, e espero continuar aprendendo.

A Kelly Aline, amiga baiana. Obrigada por sempre ter sido minha amiga, e por me incentivar tanto. Aprendi muito com você, pois você tem muito a ensinar.

Ao querido “menino Paulo” por toda disponibilidade e empenho em ajudar e contribuir para a realização desse trabalho. Menino, sem a sua ajuda seria impossível, muito obrigada!



A querida Adriana Nicoletti que começou como minha estagiária, e desde então tem me ensinado muito. Dri, não me surpreende o quanto você é competente... Acredite, eu sempre soube.

A Jessica pelo empenho em fazer com que tudo fosse realizado de uma maneira impecável, e pela capacidade de doação. Sua ajuda foi fundamental. Obrigada pela amizade.

A Talita por estar sempre preparada para ajudar e ensinar algo com uma impressionante doação, e por ser essa pessoa tão iluminada. Obrigada Xuxu, você ajudou muito.

A Martha pelo incrível apoio e ajuda nos momentos mais críticos, de um modo acolhedor que só quem é mãe pode ter.

A Elo, Danilo, Lorena, Paula Peraro, Paula Ignez, Renata Picão, Cecília Godoy e Vitor pela disponibilidade para a realização de procedimentos no Alerta, e principalmente pela disposição em ajudar.

A Soraya, Liana, Fernanda Inoue, Raquel, Zonta, Thaís, André, Vinicius, Roberto, Thomas, Cecília Cergole, Miriam, Paula Koga, Amilton, Alinne e Cynthea pela convivência diária no LEMC, e pelos ensinamentos adquiridos com cada um.

A Fernanda Marques que “aos quarenta e cinco do segundo tempo” fez possível a realização do PFGE.

A Eliete pelo período em que convivemos no LEMC e por dividir seu conhecimento riquíssimo em microbiologia. Muito obrigada por participar desse trabalho, admiro muito você!!!!

Aos meus pais Abinel e Wilma por todo incentivo, apoio, carinho e por toda a sabedoria. Vocês são fundamentais nesse trabalho.

Ao meu marido Marcelo, por ser o grande responsável por eu voltar a estudar, e por sempre me apoiar. Má, obrigada por toda sua dedicação e carinho, você foi fundamental para que tudo isso acontecesse.

Ao meu irmão Fabio e cunhada Priscila, pelo incentivo, apoio, torcida e por serem os responsáveis pelos maiores presentes da minha vida: Felipe e Gabriela. A vida é muito melhor com a presença deles.

As amigas Neia e Neusa por estarem presentes em todos os momentos importantes da minha vida. A torcida, o apoio e o acolhimento de vocês é sempre fundamental.

A minha família “agregada” Piracicabana, Ramon, Suelen, Diego, Juliana, Mauro, Carlos, e em especial a querida “cunha” Denise, o cunhado Adherbal e minha sogra Annita, obrigada pelo apoio e incentivo em TODOS os aspectos. Realmente é muito bom sentir-se acolhida por vocês.

Às minha amigas Ró, Telma, Cris e primas Carla e Roberta pelo constante apoio e incentivo “virtual”, porém fundamental para a conclusão desse trabalho.

A querida Eunice por ter possibilitado um conhecimento que não está presente em nenhuma literatura.

A todos que fizeram parte direta ou indiretamente da realização desse trabalho,  
meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	X
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	XII
ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Agente Etiológico .....	1
1.2. Epidemiologia das Infecções por <i>Acinetobacter spp.</i> .....	3
1.3. Infecções da Corrente Sanguínea Causada por <i>Acinetobacter spp.</i> .....	5
1.3.1. Programas de Vigilância.....	6
1.4. Fatores de Risco para o Desenvolvimento de ICS por <i>Acinetobacter spp.</i> .....	7
1.5. Mecanismos de Resistência aos Carbapenêmicos em <i>Acinetobacter spp.</i> .....	8
1.5.1. Alteração no sítio de ação dos antimicrobianos .....	9
1.5.2. Produção de $\beta$ -Lactamases .....	10
1.5.3. $\beta$ -Lactamases do tipo Amp C.....	14
1.5.4. $\beta$ -Lactamases de Espectro Ampliado (ES $\beta$ Ls).....	15
1.5.5. Carbapenemases .....	16
1.5.5.1. Carbapenemases serinas (oxacilinas).....	16
1.5.6. Metallo- $\beta$ -Lactamases (M $\beta$ L) .....	20
1.5.7. Impermeabilidade de Membrana Externa .....	22
1.5.7.1. Porinas .....	22
1.5.7.2. Hiperexpressão de Bomba de Efluxo .....	24
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Casuística do Estudo .....	28
3.2. Amostras Bacterianas .....	29
3.3. Testes Microbiológicos e Moleculares.....	32
3.3.1. Confirmação da Identificação Bacteriana e Teste de Sensibilidade pelo Sistema Automatizado Phoenix.....	31

3.3.2. Perfil de Sensibilidade aos Carbapenêmicos (Imipenem e Meropenem) e Ampicilina/Sulbactam pela Metodologia de Diluição em Ágar.....	33
3.3.3. PCR Multiplex em Tempo Real para Detecção de Metalo- $\beta$ -Lactamase (M $\beta$ L).....	34
3.3.4. Detecção Genotípica de OXA Carbapenemases por PCR Multiplex.....	35
3.3.5. Avaliação da Similaridade Genética pela Técnica de Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	37
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Resultados do Projeto Scope Brasil.....	40
4.2. Determinação da CIM para os Antimicrobianos Imipenem, Meropenem e Ampicilina/Sulbactam através da Técnica de Diluição em Ágar.....	412
4.3. PCR Multiplex em Tempo Real para Detecção de Metalo- $\beta$ -Lactamase (M $\beta$ L).....	45
4.4. PCR Multiplex para detecção de genes codificadores de OXA.....	46
4.5. Avaliação da Similaridade Genética pela Técnica de Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	49
5. DISCUSSÃO .....	51
6. CONCLUSÕES .....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8. RESUMO .....	77
9. ABSTRACT .....	78
10. ANEXOS.....	79

## Índice de Abreviaturas e Siglas

ATCC - *American Type Culture Collection*

CDC – *Center for Disease Control and Prevention*

CESP – *Citrobacter freundii, Enterobacter spp., Proteus vulgaris, Morganella morganii, Pseudomonas aeruginosa*

CIM - *Concentração Inibitória Mínima*

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

EARSS – *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*

EDTA – *Ácido Etileno Diamino Acético*

ES $\beta$ L - *Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase*

ICS – *Infecções de Corrente Sanguínea*

INSPEAR - *International Network for the Study and Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance*

IS - *Insertion Sequence*

LEMC - *Laboratório Especial de Microbiologia Clínica*

M $\beta$ L - *Metalo- $\beta$ -Lactamase*

MR – *Multiresistente*

MYSTIC – *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information*

NNIS – *National Nosocomial Infection Surveillance*

OMP - *Outer Membrane Protein*

PBP - *Penicillin Binding Protein*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

SCOPE - *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*

SIRS – *Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica*

TBE - Tris-Borato-EDTA

TSB - *Tryptone Soy Broth*

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

## Índice de Tabelas e Figuras

<b>Tabela 1.</b> Características funcionais e moleculares dos principais grupos de $\beta$ -Lactamases.....	13
<b>Tabela 2-</b> Centros médicos participantes do Projeto SCOPE Brasil (Junho de 2007 a Julho de 2009).....	30
<b>Tabela 3-</b> Oligonucleotídeos utilizados como iniciadores e tamanho do amplicon para a detecção dos genes codificadores de OXA carbapenemases.....	36
<b>Tabela 4.</b> Principais patógenos <sup>a</sup> isolados em hemoculturas de pacientes admitidos em hospitais brasileiros, em comparação com dados do programa SCOPE Norte-Americano (Projeto SCOPE Brasil, junho 2007 – julho 2009).....	40
<b>Tabela 5.</b> Patógenos Gram negativos mais frequentemente isolados em hemoculturas de pacientes admitidos em hospitais brasileiros (Projeto SCOPE Brasil junho 2007- julho 2009).....	41
<b>Tabela 6.</b> Descrição do perfil de sensibilidade e resistência através da metodologia de diluição em ágar dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. por região do país.....	43
<b>Tabela 7.</b> Frequência dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp resistentes aos carbapenêmicos que apresentaram gene <i>bla</i> <sub>IMP</sub> distribuídos por centro participante e região o país.....	45
<b>Tabela 8.</b> Resultados da pesquisa dos genes de OXA em isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. resistentes aos carbapenêmicos distribuídos por Região do país.....	47
<b>Figura 1-</b> Descrição da distribuição geográfica e contexto genético das oxacilinases em <i>A. baumannii</i> .....	19
<b>Figura 2-</b> Perfil de resistência aos carbapenêmicos imipenem e meropenem e ampicilina/sulbactam de 206 isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. distribuídos por região do país.....	44
<b>Figura 3.</b> Distribuição do gene <i>bla</i> <sub>OXA23</sub> -like nos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. resistentes aos carbapenêmicos entre as regiões do país.....	48
<b>Figura 4.</b> Dendograma dos perfis de similaridade genética do PFGE através do programa <i>BioNumerics</i> versão 5.0 dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp.	

resistentes aos carbapenêmicos e carreadores do gene *bla<sub>IMP</sub>* provenientes de centros de diferentes regiões geográficas brasileiras.....50



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Agente Etiológico

Microrganismos do gênero *Acinetobacter* são importantes patógenos relacionados a infecções hospitalares, principalmente em pacientes debilitados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (Bergogne-Berezin e Towner, 1996; Lee *et al.*, 2004; Prashanth e Badrinath, 2006; Simhon *et al.*, 2001).

*Acinetobacter* é classificado na família *Moraxellaceae*, e inicialmente foi nomeado como *Micrococcus calcoaceticus*. Entretanto, em 1960, um estudo avaliou as características bioquímicas desse microrganismo e concluiu que este representava um novo gênero que passou a ser chamado de *Acinetobacter* contendo apenas a espécie *Acinetobacter calco-aceticus* (Rossau *et al.*, 1991; Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Baumann, Doudoroff e Stanier, 1968).

Microscopicamente esses microrganismos são cocobacilos Gram-negativos, não esporulados, que apresentam movimento por contração devido à presença de fímbrias polares, possuem metabolismo oxidativo, não fermentativo e multiplicam-se bem entre 33 e 35°C em meios de cultura comumente utilizados em rotina laboratorial; em meio de cultura MacConkey formam colônias de coloração levemente rosa, devido a pouca oxidação da lactose, convexas, translúcidas e opacas com reações de oxidase negativa e catalase positiva (Pagel e Seyfried, 1976).

Através de estudos baseados na técnica de hibridização do DNA, foram descritos 32 grupos homólogos chamados de genomoespécies dentro do gênero *Acinetobacter*, porém apenas 19 destas genomoespécies foram nomeadas. (Nemec *et al.*, 2009; Vaneechoutte *et al.*, 2009; Gundi *et al.*, 2009).

Esses microrganismos estão amplamente distribuídos na água, no solo e microbiota de humanos e animais (Munoz-Price e Weintein, 2008). Os isolados das espécies de *Acinetobacter* são intrinsecamente resistentes a muitos antimicrobianos e desinfetantes, propagam-se facilmente entre pacientes, e são resistentes à dessecação por longos períodos, deste modo podem persistir no ambiente hospitalar por longos períodos, podendo chegar até a vinte e sete dias (Gales *et al.*, 2001; Munoz-Price e Weinstein, 2008; Zarrili *et al.*, 2004).

Apesar do seu caráter oportunista, as espécies de *Acinetobacter* possuem características reconhecidas como fatores de virulência, principalmente entre amostras envolvidas em quadros infecciosos. Algumas das características das espécies de *Acinetobacter* que podem favorecer a virulência destes microrganismos 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 microrganismo no hospedeiro (Bergogne-Berezin e Towner, 1996; Joly-Guillou, 2005).

A capacidade de formação de biofilme por *Acinetobacter* spp. foi estudada em dispositivos implantados em pacientes e em materiais utilizados na produção destes dispositivos (Hendrickx, Hausner e Wuertz, 2003; Tomaras *et al.*, 2003).

## **1.2. Epidemiologia das Infecções por *Acinetobacter* spp.**

O gênero *Acinetobacter* tem se destacado desde o início dos anos setenta como um patógeno oportunista emergente, causando frequentemente graves infecções nosocomiais, principalmente na forma de surtos e esporadicamente, casos de infecções na comunidade (Villegas e Hartstein, 2003; Kanemoto *et al.*, 2003).

Na última década, o microrganismo *Acinetobacter baumannii* multi-resistente (MR) têm sido relatado como o principal patógeno nosocomial em várias partes do mundo, sendo responsável por vários surtos (Villegas e Hartstein, 2003), resultando em aumento significativo de mortalidade e de custos hospitalares (Zhou *et al.*, 2007).

Desde o início de 1980, surtos de infecções hospitalares por *A. baumannii* tem sido descritos na Europa, principalmente na Inglaterra, França, Alemanha, Itália, Espanha e Holanda (Bergogne-Berezin e Towner, 1996; Fournier e Richet, 2006; Villegas e Hartstein, 2003).

Nos Estados Unidos, em 1991 e 1992 foram descritos surtos de *A. baumannii* MR em um hospital de Nova York (Go *et al.*, 1994).

Posteriormente, outros surtos de infecções causadas por *A. baumannii* MR em hospitais em Nova York foram descritos (Jones *et al.*, 2004; Landman *et al.*, 2007; Landman *et al.*, 2002; Quale *et al.*, 2003).

Um estudo do *National Nosocomial Infection Surveillance* (NNIS) com dados coletados de 1986 a 2003 envolvendo vários hospitais nos Estados Unidos demonstrou um aumento significativo de isolados de *Acinetobacter* spp. MR, com resistência de até 20% ao imipenem. Em um estudo mais recente do Programa MYSTIC com 76 centros entre os anos de 2004 e 2005, foi demonstrado que apenas 60 % dos isolados apresentaram sensibilidade ao imipenem (Unal e Garcia-Rodriguez, 2005).

Um estudo do programa de vigilância SENTRY demonstrou que as taxas de resistência ao imipenem na América Latina estão entre as mais altas do mundo. No período de 2002 a 2004, apenas 71% dos isolados apresentaram sensibilidade a imipenem ou meropenem (Tognim *et al.*, 2004).

Em um estudo de Brink e colaboradores, foi demonstrado que aproximadamente 30% dos isolados de infecção de corrente sanguínea na África do Sul são resistentes aos carbapenêmicos (Brink *et al.*, 2007). Esses isolados resistentes são endêmicos em algumas unidades, como unidade de pacientes queimados e UTI, e foram disseminadas entre os hospitais (Marais *et al.*, 2004).

No Brasil, *A. baumannii* MR tem sido frequentemente isolado na última década, e em estudos multicêntricos esse microrganismo encontra-se entre as principais espécies associadas a infecções hospitalares (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Gales *et al.*, 2003.; Sader *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2009).

Altas taxas de colonização de pele, trato respiratório e digestivo tem sido observadas durante os surtos. A orofaringe é um dos sítios predominantes de colonização de *A. baumannii* em pacientes hospitalizados. As mucinas presentes na cavidade oral são o primeiro sítio de ligação do microrganismo e, portanto podem funcionar como receptores de aderência bacteriana (Koeleman *et al.*, 2001). Em particular surtos envolvendo ventilação mecânica em pacientes de UTI são associados com alta taxa de colonização do trato respiratório o que indica contaminação do equipamento de terapia respiratória como possível fonte do surto. Pacientes com freqüente colonização da pele durante o surto representam um papel importante na subsequente contaminação das mãos dos profissionais da saúde contribuindo para a persistência dos surtos (Bergogne-Bérézin, Towner, 1996; Weist *et al.*, 2002).

### **1.3. Infecções da Corrente Sanguínea Causada por *Acinetobater* spp.**

Estima-se aproximadamente 250.000 novos casos de ICS anualmente nos Estados Unidos (Wisplinghoff *et al.* 2004). As Infecções de corrente sanguínea (ICS) caracterizam-se como uma importante causa de morbidade e mortalidade, representando 5 a 15% de todos os casos de infecções adquiridas no ambiente hospitalar (Diekema e Pfaller 2007), estando representada entre as dez mais frequentes causas de morte nos Estados Unidos (CDC 2009; Friedland *et al.* 2003).

Na Europa e EUA, o número de ICS causadas por bactérias Gram positivas têm se tornado cada vez mais freqüentes, e correspondem a 52,9% e

65%, respectivamente (Bouza *et al.*, 2001; Wisplinghoff *et al.*, 2004). No Brasil, embora a maior incidência das ICS seja representada por *Staphylococcus aureus* (15,9%) e por *Staphylococcus* coagulase negativo (15,7%), os bacilos Gram negativos representam mais de 50% de todos os microrganismos causadores de ICS, sendo *A. baumannii* o quarto microrganismo mais isolado (Andrade *et al.*, 2008).

Alguns estudos descreveram que a incidência dessas infecções varia de 1% em UTI (Warren *et al.* 2001), a 36% em transplantados de medula óssea (Collin *et al.* 2001). A taxa de mortalidade pode variar de 12% em unidades de internação geral, a 80% entre os pacientes internados na UTI (Gatell *et al.* 1988; Pittet *et al.* 1993). O tempo de permanência prolongado na UTI, associado a uma terapia antimicrobiana empírica inapropriada, caracteriza-se como um importante preditor de morte entre esse grupo de pacientes (Bryan *et al.* 1983; Kollef e Fraser 2001; Pittet, Tarara e Wenzel 1994; Tumbarello *et al.* 2006). A terapia antimicrobiana adequada pode reduzir em até 25% a taxa de mortalidade de pacientes com ICS por *A. baumannii* (Erbay *et al.*, 2009).

### **1.3.1. Programas de Vigilância**

Com o aumento significativo de infecções causadas por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos na última década em várias partes do mundo, o CDC criou a Rede Internacional para o estudo e Prevenção da Resistência Antimicrobiana Emergente (*International Network for the Study and Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance – INSPEAR*). As infecções causadas por esse microrganismo foram definidas como um evento de sentinela global,

exigindo intervenções uma vez que as opções terapêuticas tornam-se cada dia mais escassas (Marcham *et al.*, 2007).

Entre os programas de vigilância que monitoram microrganismos resistentes aos carbapenêmicos, estão o Programa SCOPE (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*) (Wisplinghoff *et al.* 2004), o Programa SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) (Andrade *et al.* 2008), o Programa MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information*) (Goossens e Grabein 2005) e o Programa EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM (EARSS) 2006.

Em um estudo do programa SENTRY no período de 2003 a 2008 em hospitais brasileiros, *Acinetobacter* spp foi o quarto patógeno (8%) mais comum entre os bacilos Gram negativos recuperados de infecções da corrente sanguínea, apresentando altas taxas de resistência a todos os antimicrobianos, exceto Polimixina B (Andrade *et al.* 2008).

De acordo com dados do Programa SCOPE americano, *A. baumannii* foi o responsável por 25% das ICS (Wisplinghoff *et al.* 2004).

#### **1.4. Fatores de Risco para o Desenvolvimento de ICS por *Acinetobacter* spp.**

Entre os principais fatores de risco associados à ICS por *Acinetobacter* spp. destacam-se: ventilação mecânica, presença de sonda nasogástrica, cateter arterial, cateter urinário e permanência prolongada em UTI (Zakuan *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2009).

Outro fator de risco muito importante é o uso prévio de antimicrobianos, como penicilinas, cefalosporinas e aminoglicosídeos (Zakuan *et al.*, 2009). Por isso torna-se fundamental a terapia antimicrobiana adequada além de um programa eficaz de uso racional de antimicrobianos (Erbay, *et al.*, 2009; Zakuan *et al.*, 2009).

A grande diversidade dos fatores de risco, associada à aquisição de ICS hospitalar por microrganismos multiresistentes, deve-se às grandes diferenças epidemiológicas locais ou mesmo às diferenças epidemiológicas avaliadas em cada estudo. Dessa forma, é importante a identificação dos fatores de risco para aquisição de infecção hospitalar, tendo em vista que o conhecimento desses fatores permite a elaboração de estratégias específicas de prevenção (CDC, 2009).

### **1.5. Mecanismos de Resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp.**

Um dos principais fatores que vem contribuindo para o aumento de linhagens resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos, favorecendo o surgimento de surtos, é o uso extensivo de terapia antimicrobiana em hospitais, incluindo  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (Koeleman *et al.*, 1997; Zarrilli *et al.*, 2004; Giamarellou, Antoniadou e Kanellakopoulou, 2008 ).

Além disso, *Acinetobacter* spp são intrinsicamente resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos, e vem demonstrando um grande potencial para a aquisição de novos determinantes de resistência,



respondendo rapidamente a pressão seletiva do meio ambiente (Bergogne-Berezin e Towner, 1996; Peleg *et al.*, 2008).

Podem ocorrer diferenças nos padrões de resistência entre os isolados de *A. baumannii* devido a diferentes padrões de uso de antimicrobianos e diversas situações epidemiológicas, incluindo políticas de medida de controle de infecção relacionada à assistência à saúde, dispensação e escalonamento de antimicrobianos (Cisneros e Rodriguez-Bano, 2002). Essa diferença é observada em isolados de diferentes países, em isolados do mesmo país em diferentes hospitais, ou até diferenças em unidades de internação de um mesmo hospital. No entanto, a tendência para a crescente resistência desse microrganismo é indiscutível (Falagas *et al.*, 2007).

Os principais mecanismos de resistência encontrados em *Acinetobacter* spp. são: (i) alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (*Penicillin Binding Protein* - PBPs); (ii) perda ou diminuição na expressão de proteínas de membrana externa (porinas); (iii) hiperexpressão de bombas de efluxo e (iv) produção de  $\beta$ -lactamases (Higgins *et al.*, 2004).

### **1.5.1 Alteração no sítio de ação dos antimicrobianos**

As PBPs são enzimas envolvidas na síntese da parede bacteriana e são inativadas por antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos. A interação do antimicrobiano com essas PBPs geralmente é específica e qualquer mínima variação da molécula pode causar falha da ação do antimicrobiano na célula bacteriana. As PBPs são carboxipeptidases e transpeptidases localizadas na membrana citoplasmática que atuam na etapa final da

síntese do peptidoglicano bacteriano, catalisando a transpeptidação entre as duas subunidades de mureína. Algumas delas atuam como enzimas líticas favorecendo a formação do septo para a divisão celular e outras nas etapas finais da formação da parede bacteriana (Spratt e Cromei, 1998).

A resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos devido a alterações de PBPs é mais comum nos microrganismo Gram positivos. A inibição destas enzimas por parte dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos produz a morte bacteriana pela lise celular. Em *Acinetobacter* spp. já foram relatadas alterações na expressão e na afinidade das distintas PBPs frente aos diferentes antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. Fernandez-Cuenca e colaboradores descreveram a redução na expressão de PBP2, associada à produção de  $\beta$ -lactamases, como o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos mais freqüente em isolados de *A. baumannii* em Sevilha, na Espanha (Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003; Bujis *et al.*, 2008; Russo *et al.*, 2009).

### **1.5.2. Produção de $\beta$ -Lactamases**

As  $\beta$ -lactamases são enzimas que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico, impossibilitando assim a sua atividade antimicrobiana e é um dos principais mecanismos de resistência nas bactérias Gram negativas (Livermore, 1995). De modo geral, as  $\beta$ -lactamases são capazes de hidrolisar as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, e isso depende da afinidade que a enzima possui por seu substrato, ou seja, o antimicrobiano, por essa razão algumas subclassificações as denominam penicilinases, cefalosporinases ou carbapenemases, e essa interação entre os diversos tipos de enzimas e seus substratos, resultam em compostos inativos que permitem a

sobrevivência da célula bacteriana (Bush, 2001). Entretanto, alguns fatores podem interferir na capacidade das  $\beta$ -lactamases conferirem resistência, entre os quais destaca-se a quantidade de enzima produzida, a habilidade da enzima em hidrolisar o antimicrobiano e a velocidade com que o  $\beta$ -lactâmico penetra pela membrana celular externa (Livermore, 1991).

Nas bactérias Gram negativas, as  $\beta$ -lactamases encontram-se estrategicamente presentes no espaço periplasmático e podem alcançar maiores concentrações e agir de modo mais eficaz sobre os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos que estão atravessando este espaço para atingir as PBPs. Este fato explica porque esse mecanismo torna-se mais eficiente nessas bactérias e não tão eficientes em bactérias Gram positivas. Nas bactérias Gram positivas, as  $\beta$ -lactamases são, em sua maioria, induzíveis e excretadas para o meio extracelular, onde acontece a hidrólise do composto  $\beta$ -lactâmico antes que este se ligue as PBPs na membrana celular, dessa forma irão apresentar uma atividade menor que as  $\beta$ -lactamases produzidas pelas bactérias Gram negativas (Bush, Jacoby e Medeiros , 1995).

A síntese das  $\beta$ -lactamases pode ser mediada por genes no cromossomo ou mediada por plasmídeos e transposons, podendo ser induzida tanto pela presença de  $\beta$ -lactâmicos, como de precursores de parede celular no meio extracelular (Konemam *et al.* 2001).

Existe uma grande diversidade de tipos de  $\beta$ -lactamases, e sua classificação foi definida por Ambler em 1980, baseado nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos das enzimas e somente quatro classes moleculares de  $\beta$ -lactamases foram descritas: A)  $\beta$ -lactamases de espectro

ampliado (ES $\beta$ Ls), penicilinases e carbenicilinases; B) metalo- $\beta$ -lactamases; C) cefalosporinas cromossomais; e D) oxacilinases (Ambler, 1980).

Em 1995, Bush, Jacoby e Medeiros propuseram um esquema baseado nas propriedades bioquímicas, estrutura molecular e sequência nucleotídica das enzimas, combinando as características estruturais e funcionais das  $\beta$ -lactamases, classificando-as em grupos funcionais que variam de 1 a 4, apresentando subgrupos nos grupos 2 e 3, os quais são diferenciados de acordo com seu substrato específico e perfil inibidor (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995).

A Tabela 1 apresenta, de modo simplificado, a correlação entre a classificação molecular de Ambler (1980) e a de Bush, Jacoby e Medeiros (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995) além das características funcionais das  $\beta$ -lactamases.

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

Classificação de Bush – Jacoby - Medeiros, 1995		Classificação de Ambler, 1980	Características funcionais
Grupo Funcional	Subgrupos	Classe Molecular	
1		C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais frequente em Gram negativos. Isoladamente conferem resistência a todos os $\beta$ -lactâmicos, exceto carbapenens (a menos que exista alteração de porina). Não são inibidas pelo ácido clavulânico.
2		A, D	A grande maioria das enzimas é inibida por ácido clavulânico.
	2 <sup>a</sup>	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. conferem altos níveis de resistência às penicilinas.
	2b	A	$\beta$ -lactamases de espectro reduzido de bactérias Gram-negativas. Inclui TEM-1 e SHV-1.
	2be	A	$\beta$ -lactamases de espectro ampliado conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos (ESBLs).
	2br	A	$\beta$ -lactamases derivadas da TEM e SHV resistentes aos inibidores de $\beta$ -lactamases (IRT).
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina.
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina), pouco inibidas pelo ácido clavulânico.
	2e	A	Cefalosporinas inibidas pelo ácido clavulânico.
	2f	A	Enzimas que possuem um sítio ativo serina, que hidrolisam carbapenens e são inibidas pelo ácido clavulânico.
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- $\beta$ -lactamases, que conferem resistência aos carbapenens e todos os outros $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam.
4		ND	Enzimas não sequenciadas, que não são categorizadas em outros grupos.

Abreviatura: N.D., não determinada (Adaptado do artigo de Bush, 2001).

### 1.5.3 - $\beta$ -Lactamases do tipo AmpC

As  $\beta$ -lactamases do grupo 1 de Bush, Jacoby e Medeiros (1995) e da classe molecular C de Ambler (1980) conhecidas como  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC, são enzimas cromossômicas ou plasmidiais podendo ser induzíveis ou não. Na ausência de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos é normalmente produzida em baixos níveis, mas em presença de  $\beta$ -lactâmicos indutores como, por exemplo, cefoxitina e imipenem, sua produção pode aumentar de 100 a 1000 vezes, e assim que estes indutores forem retirados, a produção pode voltar a níveis basais (Jones, 1998; Philippon, Arlet e Jacoby, 2002; Sanders *et al.*, 1997).

As  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC conferem resistência às penicilinas, inclusive as associações com inibidores de  $\beta$ -lactamases (sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico), cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> gerações, e aos monobactâmicos (aztreonam) (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995). Embora essas enzimas sejam mais freqüentes em isolados pertencentes ao grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* e *Morganella morgani*), já foram detectadas no gênero *Acinetobacter* (Danes *et al.*, 2002; Bou e Martinez-Beltran, 2000).

Existe a possibilidade dos genes responsáveis pela hiperprodução de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC estarem localizados em sequências de inserção que facilmente poderão ser associadas a um forte promotor, resultando em altos níveis de resistência às cefalosporinas (Corvec *et al.*, 2003).

#### 1.5.4 - $\beta$ -Lactamases de Espectro Ampliado (ES $\beta$ Ls)

Estas enzimas representam o maior grupo de  $\beta$ -lactamases estudadas atualmente (Bradford, 2001; Bush, Jacoby e Medeiros, 1995; Gniadkowski, 2008). Pertencem à classe molecular A de Ambler (1989) e estão distribuídas no grupo 2 de Bush, Jacoby e Medeiros (1995). As ES $\beta$ L apresentam uma serina no seu sítio ativo e são codificadas por genes localizados em plasmídeos, conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos monobactâmicos, mas não aos carbapenêmicos. (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995; Rossolini, D'Andrea e Mugnaioli, 2008; Winokur *et al.*, 2001).

A primeira ES $\beta$ L descrita em *Acinetobacter* spp. na Europa e Ásia foi a PER-1 (Yong *et al.*, 2003; Vahaboglu *et al.*, 1997). Em agosto de 2003, outra ES $\beta$ L foi descrita em *A. baumannii* pela primeira vez, a VEB-1, que pertenciam a um mesmo clone e foram responsáveis por um surto em um hospital de Valência, na França (Poirel *et al.*, 2007). Recentemente uma nova ES $\beta$ L foi descrita em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. denominada SCO-1 que possui alta capacidade de hidrolisar penicilina e cefalosporinas, porém apresenta uma capacidade baixa de hidrolisar os carbapenêmicos (Poirel *et al.*, 2007). Outra ES $\beta$ L identificada recentemente em *A. baumannii* foi a GES, conferindo resistência aos carbapenêmicos (Queenan e Bush, 2007; Moubareck *et al.*, 2009)

### **1.5.5 - Carbapenemases**

Os carbapenêmicos tornaram-se fundamentais para o tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes, porém torna-se preocupante o número de bactérias Gram negativas resistentes a essa classe de antimicrobianos. As enzimas do tipo carbapenemases são capazes de hidrolisar não só os carbapenêmicos, mas outras penicilinas e cefalosporinas (Queenan e Bush, 2007).

#### **1.5.5.1 - Carbapenemases serina (Oxacilinas)**

As carbapenemases da classe D (Ambler, 1980), também chamadas de carbapenemases do tipo OXA, apresentam baixa atividade hidrolítica aos carbapenêmicos (oxa-carbapenemases) e formam um grupo heterogêneo de acordo com suas propriedades estruturais e bioquímicas. Apresentam em seu sítio ativo um grupamento serina, e são chamadas de oxacilinas por possuírem a capacidade de hidrolizar a oxacilina de maneira mais eficiente e rápida que as penicilinas clássicas, além da já mencionada capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos (Naas *et al.*, 2005; Naas e Nordmann, 1999; Nordmann e Poirel, 2002).

A produção destas enzimas, em associação com outro mecanismo de resistência, como por exemplo, alteração da permeabilidade da membrana externa, hiperexpressão de um sistema de efluxo ou alteração do sítio de ligação do antimicrobiano, pode resultar em alto grau de resistência aos carbapenêmicos (Queenan e Bush, 2007).

Embora a maioria dessas enzimas sejam codificadas por genes inseridos em cassetes de integron de classe 1, estudos recentes têm



demonstrado que estas podem estar em outras estruturas como sequências de inserção e transposons (Recchia e Hall, 1997; Poirel, Naas e Nordman, 2010).

Essas enzimas conferem uma diminuição na sensibilidade ou resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*, sendo suas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) geralmente superiores a 8µg/mL (Heritier *et al.*, 2005). Até o momento foram descritas cerca de 150 variantes de oxacilinasas, divididas em oito grupos, porém apenas quatro foram descritas em *Acinetobacter* spp (Poirel, Naas, Nordman, 2010).

O grupo 1 das oxacilinasas é constituído pelas enzimas OXA-23, OXA-27 e OXA-49 (Afzal-Shah, Woodford e Livermore, 2001). Estas enzimas são codificadas por genes correspondentes ao grupo *bla*<sub>oxa-23</sub>-like (Peleg, Seifert e Paterson, 2008).

A primeira oxacilinase identificada foi a OXA-23, em 1985 na Escócia, antes mesmo da aprovação do uso de carbapenêmicos, dessa forma uso clínico do imipenem provavelmente não foi responsável pela evolução das carbapenemases de classe A e D, pois estas enzimas já estariam presentes nestes microrganismos (Scaife *et al.*, 1995).

Esta enzima foi chamada inicialmente de ARI-1, e após caracterizações genéticas e bioquímicas foi renomeada como OXA-23, sendo encontrada em plasmídeo (Donald *et al.*, 2000). No Brasil, estudos demonstram que a OXA-23 tem sido responsável pelo fenótipo de multirresistência em isolados hospitalares de *A. baumannii* em várias cidades, como São Paulo e Rio de Janeiro, assim como surtos de infecção em Curitiba e Ponta Grossa (Mostachio *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2009; Dalla-Costa *et al.*, 2003).

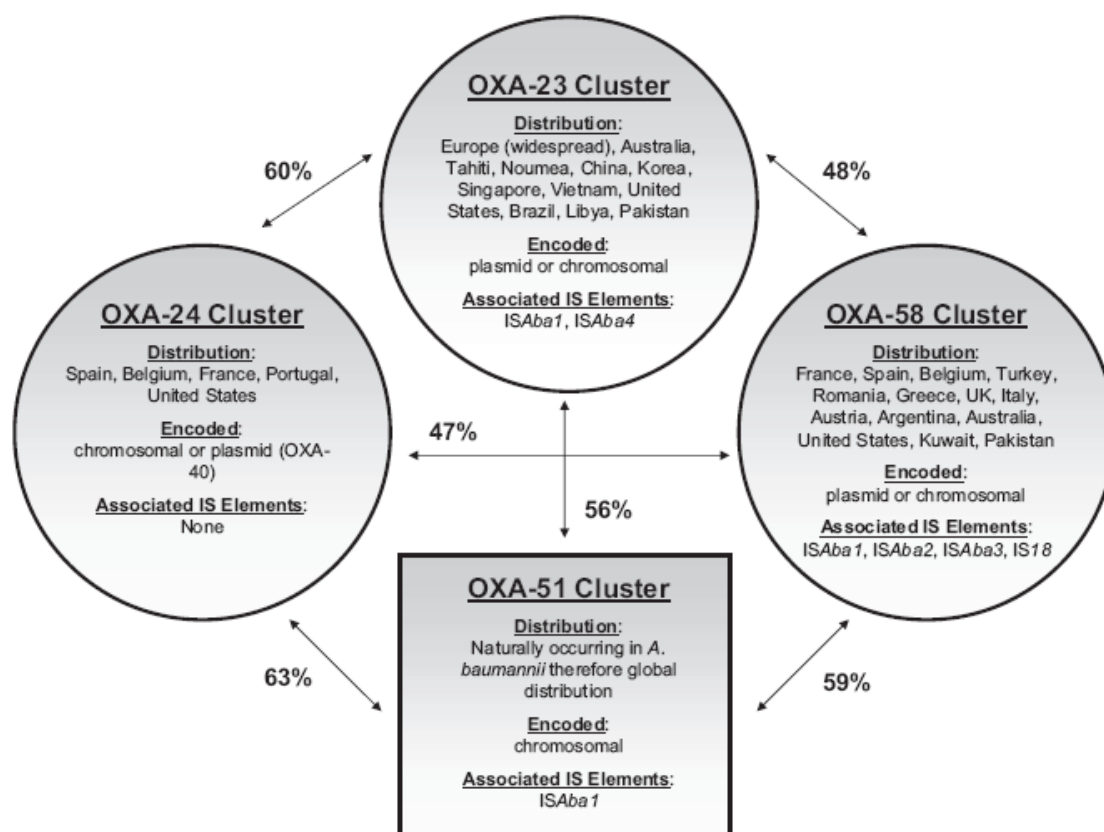
O segundo grupo de oxacilinases é composto pelas enzimas OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 e OXA-72 e são codificadas por genes correspondentes ao grupo *bla*<sub>oxa-24</sub>-like (Walther-Rasmussen e Høiby, 2006; Heritier *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2009; Peleg, Seifert e Paterson, 2008). O primeiro relato de OXA-72 foi descrito na Tailândia em 2004, em isolados de *A. baumannii*, sendo localizado no plasmídeo (Lu *et al.*, 2009).

O terceiro, e maior grupo das oxacilinases é composto pelas enzimas OXA-51, -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80, -82. Este grupo de enzimas é codificado por genes agrupados no complexo *bla*<sub>oxa-51</sub>-like (Brown, Young e Amyes, 2005; Peleg, Seifert e Paterson, 2008).

A OXA-51 está localizada no cromossomo de *A. baumannii*, portanto é intrínseca dessa espécie. Essa enzima tem importância, pois a expressão do gene que a codifica possui uma baixa atividade hidrolítica, mantendo sensibilidade ao imipenem (Heritier *et al.*, 2005; Brown, Young e Amyes, 2005). Os estudos demonstram que a migração da sequência de inserção IS*Aba*-1 para a região upstream do gene *bla*<sub>oxa-51</sub> pode promover uma hiperexpressão desse gene, reduzindo assim a sensibilidade do *A. baumannii* aos antimicrobianos carbapenêmicos (Turton *et al.*, 2006).

O quarto grupo de oxacilinases é representado pela OXA-58, que é codificada pelo gene pertencente ao complexo *bla*<sub>oxa-58</sub>-like. O primeiro relato de OXA-58 foi em um isolado de *A. baumannii*, na França, em 2003, e foi localizado em plasmídeo bacteriano, desde então, vários estudos vem reportando a presença dessa enzima mundialmente (Marque *et al.*, 2005; Peleg *et al.*, 2006 a e b; Poirel *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2006; Heritier *et al.*, 2005).

Dentre todas as subfamílias de oxacilinases, algumas merecem destaque por serem fatores determinantes para a resistência em *A. baumannii*, são OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like (Poirel e Nordmann, 2006). A distribuição e contexto genético das OXAs estão descritos na Figura 1.



**Figura 1-** Descrição da distribuição geográfica e contexto genético das oxacilinases em *A. baumannii*. As porcentagens correspondem ao grau de homologia dos aminoácidos entre os *clusters* das enzimas. As enzimas localizadas dentro dos círculos correspondem às enzimas adquiridas e a do quadrado corresponde a enzima natural do microrganismo. Fonte: Peleg, Seifert e Paterson, 2008. (Transcrito como o original em inglês).

Recentemente foi descrita a OXA-143, que é codificada por plasmídeo e não foi associada a sequência de inserção (Higgins *et al.*, 2009).

### 1.5.6 - Metallo- $\beta$ -Lactamases (M $\beta$ Ls)

A produção de enzimas do tipo metallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls) é uma das principais causas de redução de sensibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos, e têm sido descritas em isolados de *Acinetobacter* spp. desde o início da década de 90 (Poirel *et al.*, 2000). Estas enzimas são pertencentes ao grupo 3 de Bush (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995) e à classe molecular B de Ambler (Ambler, 1980), e possuem a capacidade de hidrolisar todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, exceto o monobactâmico aztreonam (Nordmann e Poirel, 2002).

Essas enzimas caracterizam-se por necessitarem de dois íons divalentes, usualmente zinco, como co-fator para a atividade catalítica, por terem a mesma estrutura tridimensional e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com cátions divalentes (Murphy *et al.*, 2003). Por isso são inibidas pelo ácido etilenodiaminoacético (EDTA) ou por compostos derivados do ácido tiolático (ácido 2-mercaptopropiônico), os quais possuem a propriedade de quelar o zinco. No entanto, não sofrem ação dos inibidores das serino- $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico (Queenan e Bush, 2007).

As M $\beta$ L intrínsecas são normalmente mediadas por cromossomo (Walsh *et al.*, 1994) e são encontradas em um número limitado de espécies, como: *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium odoratum*, *Legionella gormanii*, *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia* (Hirakata *et al.*, 1998).

As M $\beta$ L adquiridas são codificadas por cassetes gênicos localizados no cromossomo ou plasmídeo bacteriano. No entanto, com exceção da enzima

SPM-1, que é codificada por um gene localizado em plasmídeo, as demais M $\beta$ L adquiridas, como por exemplo a IMP-1, são codificadas por genes localizados em integrons de classe 1 (Toleman *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2003). Esses genes podem integrar-se a transposon ou plasmídeo bacteriano, estruturas genéticas que conferem mobilidade ao gene, facilitando a disseminação dessas enzimas entre diferentes espécies bacterianas. Portanto, essas enzimas passaram a ser conhecidas como M $\beta$ Ls móveis ou adquiridas (Sacha *et al.*, 2008).

O primeiro relato de uma M $\beta$ L, a IMP-1 aconteceu em 1992, em um isolado clínico de *Serratia marcescens* no Japão, e apresentava resistência ao imipenem e cefalosporinas (Watanabe *et al.*, 1991). Em 2003 foi descrito o primeiro isolado de *A. baumannii* produtor de M $\beta$ L do tipo IMP-1 no Brasil. O isolado clínico foi proveniente de uma cultura de secreção traqueal de um paciente internado na UTI geral do Hospital São Paulo no ano de 2000 (Gales *et al.*, 2003). Desde então, a disseminação de isolados produtores de M $\beta$ Ls, tem sido frequentemente descritas em hospitais brasileiros (Lincopan *et al.*, 2005; Lincopan *et al.*, 2006; Sader *et al.*, 2005; Tognim *et al.*, 2006). Atualmente são conhecidas 24 variantes de IMP (<http://www.lahey.org/studies>).

Em 1999 foi caracterizada a segunda M $\beta$ L, denominada VIM-1, isolada de *P. aeruginosa* em Verona, na Itália, e já foi disseminada (Queenan & Bush, 2007). Atualmente, foram descritas 22 variantes dessa enzima, principalmente em isolados de *P. aeruginosa* (<http://www.lahey.org/studies>).

Em 1997 foi descrita a SPM-1, encontrada em isolado clínico de *P. aeruginosa* recuperada do trato urinário de um paciente internado no Hospital São Paulo. Essa M $\beta$ L parece estar relacionada somente com esta espécie

bacteriana, uma vez que até o momento não foi descrita em outro microrganismo (Gales *et al.*, 2003; Poirel *et al.*, 2004).

A enzima GIM-1 foi identificada em isolado de *P. aeruginosa* em 2002, em Dusseldorf, Alemanha (Castanheira *et al.*, 2004). Em 2005, na Coréia foi descrita a enzima SIM-1 (Lee *et al.*, 2005). As últimas MβLs descritas foram AIM-1 e KHM-1 (<http://www.lahey.org/studies>).

## **1.5.7 - Impermeabilidade de Membrana Externa**

### **1.5.7.1 - Porinas**

As bactérias Gram negativas apresentam uma estrutura caracterizada como membrana externa que é composta por fosfolipídeos, lipopolissacarídeos e por proteínas de membrana externa (OMP - “*outer membrane proteins*”), também conhecidas como porinas. Essa membrana externa está localizada acima da membrana citoplasmática e da camada de peptidoglicano, e atua como uma barreira permeável que elimina os compostos nocivos à célula, presentes no meio externo (Nikaido, 1994).

As porinas são proteínas que formam canais de água no seu interior e permitem a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana (Nikaido, 1989). As porinas variam de tamanho e carga elétrica de acordo com cada microrganismo (Parr Jr. *et al.*, 1987; Yamazaki *et al.*, 1989). A perda ou a diminuição da expressão dos genes codificadores das OMP desencadeia a redução da entrada de antibióticos na célula, diminuindo a concentração interna do

antimicrobiano contribuindo, conseqüentemente, no mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (Hernandez-Alles *et al.*, 1999). A redução de expressão ou perda destas porinas contribui para o aumento nos níveis de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, especialmente quando mecanismos adicionais de resistência são expressos (Martinez-Martinez, 2008).

A quantidade e tamanho reduzidos de porinas poderiam explicar a diminuição da permeabilidade de membrana externa do *A. baumannii*, que quando comparada a outras espécies, chega a 5 % menos permeável aos antimicrobianos, e este fato poderia explicar a sua resistência intrínseca a vários antimicrobianos (Obara e Nakae, 1991).

Em isolados clínicos de *A. baumannii* onde não foi observada nenhuma atividade enzimática de carbapenemases, foi detectado uma proteína de membrana externa de 29-kDa, chamada CarO, que demonstrou estar associada a resistência ao imipenem, porém, essa proteína parece possuir um canal monomérico inespecífico para o imipenem, ao contrário da OprD presente em *P. aeruginosa* (Nikaido, 2003; Siroy *et al.*, 2005).

Recentemente, uma proteína de 43-kDa, denominada D2, foi identificada em *A. baumannii* como homóloga da porina OprD, associada frequentemente com a resistência ao imipenem em isolados de *P. aeruginosa* (Dupont *et al.*, 2005). Em estudos com isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos e não produtores de carbapenemases, foi demonstrado que essa resistência estava associada à perda de OMPs de 33 a 36-kDa (Del Mar Tomas *et al.*, 2005). Outra Omp descrita em *Acinetobacter* spp. é a OmpW, que apresenta alta homologia com as OmpW encontradas em *E. coli* e *P. aeruginosa*. Entretanto, a função desta porina em *A. baumannii* ainda não foi

---

bem esclarecida, mas parece estar relacionada com a resistência *in vitro* à colistina (Vila, Martí e Sánchez-Céspedes, 2007; Hong *et al.*, 2006).

### 1.5.7.2 – Hiperexpressão de bomba de efluxo

O sistema de efluxo funciona devido à atuação de proteínas de membrana especializadas envolvidas na extrusão de substratos tóxicos de dentro da célula para o ambiente externo (Webber e Piddock, 2003). Esse sistema é expresso em todas as células vivas, e atua principalmente na proteção contra efeitos tóxicos. A resistência bacteriana a diferentes classes de antimicrobianos foi associada à hiperexpressão dessas bombas, e funcionam sinergicamente com a baixa permeabilidade da membrana externa (Poole, 2002).

Atualmente o sistema de bomba de efluxo foi agrupado em seis famílias: 1- *ATP binding cassette family* (ABC); 2- *major facilitator superfamily* (MFS); 3- *resistance-nodulation-division family* (RND); 4- *multidrug and toxic compound extrusion family* (MATE); 5- *Small Multidrug resistance family* (SMR); 6- *drug/metabolite transporter superfamily* (DMT) (Poole, 2002). Em *A. baumannii* a resistência antimicrobiana mediada por expressão de bombas de efluxo está geralmente associada aos sistemas das famílias MFS e RND. A família MFS é representada por Tet(A), Tet(B) e CImA. O determinante Tet(A) confere resistência à tetraciclina e minociclina, e o CImA confere resistência ao cloranfenicol (Fournier e Richet, 2006). O sistema de efluxo Tet, pertencente à família MFS, é um dos mais importantes mecanismos de resistência à tetraciclina em bactérias Gram negativas, e o gene pode estar presente em



transposons e inserido em plasmídio. Esse sistema é regulado pela presença da tetraciclina (Vila, Martí e Sánchez-Céspedes, 2007).

A família RND possui um complexo denominado AdeABC, foi o primeiro sistema descrito em *Acinetobacter* spp. e confere resistência aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, eritromicina, cefotaxima, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim e tigeciclina (Magnet, Courvalin e Lambert, 2001; Peleg *et al.*, 2006). Esse sistema pode causar resistência de alto grau quando é associado à presença de oxacilinas (Marque *et al.*, 2005). Essa família possui ainda mais dois sistemas, o AdeDE, já descrito em *A. baumannii* que confere resistência aos antimicrobianos citados anteriormente e também à amicacina, ceftazidima, rifampicina e meropenem (Chau *et al.*, 2004) e o sistema AdelJK, que confere resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, novobiocina e rifampicina (Damier-Piolle *et al.*, 2008). Outro sistema de efluxo descrito em *Acinetobacter* spp. é o AbeM, que pertence à família MATE. Esse sistema é responsável pela redução da CIM até por 4 vezes mais para norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacina e gentamicina (Su *et al.*, 2005).

Como *Acinetobacter* spp. tornou-se um importante patógeno em infecções hospitalares por apresentar facilidade em adquirir genes de resistência a vários antimicrobianos e grande habilidade em manter-se em ambientes hospitalares durante longos períodos, tornou-se importante o estudo desses mecanismos de resistência como fator determinante para contenção dessas infecções.



## 2. OBJETIVOS

### Geral:

- Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos e ampicilina/sulbactam, e presença de carbapenemases entre isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de infecção de corrente sanguínea de pacientes hospitalizados nos centros médicos participantes do Programa de Vigilância SCOPE Brasil, entre junho de 2007 a julho de 2009.

### Específicos:

- Caracterizar a frequência e tipos de metalo- $\beta$ -lactamases presentes nos isolados resistentes aos carbapenêmicos.
- Determinar a frequência dos genes *bla*<sub>oxa-23-like</sub>, *bla*<sub>oxa-24-like</sub>, *bla*<sub>oxa-51-like</sub>, *bla*<sub>oxa-58-like</sub> entre os isolados resistentes aos carbapenêmicos.
- Avaliar a disseminação clonal dos isolados resistentes aos carbapenêmicos e carreadores de genes codificadores de metalo- $\beta$ -lactamases.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Casuística do Estudo

O Projeto SCOPE Brasileiro é uma extensão de um estudo realizado pela *Virginia Commonwealth University*, nos Estados Unidos, denominado de SCOPE (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*) coordenado pelo Dr. Richard P. Wenzel e Dr. Michael B. Edmond, que mostraram dados epidemiológicos sobre mais de 24.000 infecções da corrente sanguínea em 49 hospitais norte-americanos durante um período de sete anos (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

As ICS hospitalares foram definidas pelo isolamento de microrganismos patogênicos de uma ou mais amostras de hemoculturas positivas em pelo menos 48 horas de admissão do paciente. Isolados bacterianos potencialmente contaminantes de pele (ex.: difteróides, *Propionibacterium* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* coagulase negativo ou *Micrococcus* spp.), coletados de pacientes em utilização de cateter venoso central e prescrição de terapia antimicrobiana para esta infecção, e exibindo ao menos um dos sintomas de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), foram incluídos.

As hemoculturas foram processadas pelos hospitais participantes do estudo. Somente a primeira hemocultura (com um ou mais microrganismos) de cada paciente foi considerada. A identificação dos isolados das hemoculturas assim como os testes de sensibilidade foram realizados pelos laboratórios afiliados aos centros hospitalares brasileiros incluídos no estudo. No total, seis laboratórios utilizaram método automatizado para identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos, três utilizaram Vitek II<sup>®</sup> (BioMérieux, North Caroline, USA) e três utilizaram o sistema BD Phoenix<sup>®</sup> (Becton Dickinson and

Company, Maryland, USA). As amostras dos nove centros que não possuíam método automatizado foram re-identificadas e testadas quanto à sensibilidade aos antimicrobianos pelo LEMC, utilizando o sistema BD Phoenix<sup>®</sup> (Becton Dickinson and Company, Maryland, USA).

Todas as amostras clínicas caracterizadas epidemiologicamente e microbiologicamente neste trabalho fazem parte do Projeto SCOPE Brasileiro. O Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina é o centro coordenador deste estudo no Brasil.

### **3.2. Amostras Bacterianas**

O Programa SCOPE Brasileiro incluiu o envio de dados epidemiológicos dos pacientes acometidos com infecções de corrente sanguínea, sendo facultativo o envio das amostras bacterianas pelos centros médicos participantes para o LEMC. Entre os 16 centros participantes do estudo, 15 optaram por enviar isolados bacterianos.

Esses isolados foram enviados mensalmente ao LEMC, em meio de transporte Amies com carvão ativado (Copan, Brescia, Itália). No LEMC, todas as amostras foram semeadas em placas de ágar sangue ou MacConkey e em seguida foram armazenadas em caldo trípico de soja (TSB- Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com glicerol 15% a -20°C.

Foram selecionadas para esse estudo todas as amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. enviadas ao LEMC, entre o período de Junho de 2007 a Julho de 2009. As amostras de *Acinetobacter* spp. foram provenientes de 13 diferentes centros médicos hospitalares participantes do Programa SCOPE Brasileiro (Tabela 2), sendo esses centros médicos representativos das cinco regiões brasileiras (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-Oeste). Apenas um centro médico participante do estudo optou por enviar somente os dados epidemiológicos.

**Tabela 2-** Centros médicos participantes do Projeto SCOPE Brasil (Junho de 2007 a Julho de 2009)

Centro Médico	Início da Coleta de Dados	Cidade/Estado
1 - Hospital São Paulo	Junho de 2007	São Paulo/SP
2 - Hospital do Rim e Hipertensão	Junho de 2007	São Paulo/SP
3 - Hospital de Diadema	Junho de 2007	São Paulo/SP
4 - Instituto de Oncologia Pediátrica (IOP/GRAAC)	Junho de 2007	São Paulo/SP
5 - Hospital Nove de Julho	Junho de 2007	São Paulo/SP
6 - Hospital Israelita Albert Einstein	Junho de 2007	São Paulo/SP
7 - Hospital Santa Casa de Porto Alegre	Outubro de 2007	Porto Alegre/RS
8 - Hospital do Coração de Natal	Janeiro de 2008	Natal/RN
9 - Hospital Universitário Walter Cantídio	Janeiro de 2008	Fortaleza/CE
10 - Hospital Santa Casa do Pará	Dezembro de 2007	Belém/PA
11 - Hospital da Unimed de Natal	Fevereiro de 2008	Natal/RN
12 - Hospital das Clínicas de Goiânia	Janeiro de 2008	Goiânia/GO
13 – Hospital de Base de Brasília	Janeiro de 2008	Brasília/DF
14 - Hospital Conceição de Porto Alegre	Mai de 2008	Porto Alegre/RS
15 - Hospital Espanhol de Salvador	Julho de 2008	Salvador/BA
16 - Hospital Estadual Universitário do Triângulo Mineiro	Janeiro de 2009	Uberaba/MG

### 3.3. Testes Microbiológicos e Moleculares

#### 3.3.1. Confirmação da Identificação Bacteriana e Teste de Sensibilidade pelo Sistema Automatizado Phoenix<sup>®</sup>

Todos os isolados encaminhados pelos centros médicos participantes como pertencentes ao gênero *Acinetobacter* spp. , ou os isolados em que o centro participante não possuía sistema de identificação automatizado, foram submetidas a re-identificação pelo sistema BD Phoenix 5.1<sup>®</sup> (Becton Dickinson, Sparks, MD 21152, USA) para a confirmação do gênero e da espécie bacteriana.

Através desse sistema também foi possível estabelecer o perfil de sensibilidade das amostras de *Acinetobacter* spp. pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), de acordo com as recomendações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), documento M100-S18, 2008.

A re-identificação bacteriana e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados, após isolamento e subcultivo das amostras em ágar sangue por duas vezes, conforme recomendado pelo CLSI, 2008. Para a realização dos testes de identificação e sensibilidade aos antimicrobianos, inicialmente, foi preparada uma única suspensão bacteriana de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL, correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Para o teste de sensibilidade, foi reservado 25 µL dessa suspensão bacteriana, que em seguida foi diluída em 8



mL de caldo e acrescida de 50 µL do indicador de oxido-redução específicos do fabricante. Essas duas suspensões foram dispensadas em orifícios específicos presentes no painel NMIC/ID 104 (Becton Dickinson, Sparks, MD 21152, USA) utilizado apenas para bactérias Gram negativas. Após o preenchimento de todos os poços contidos no painel, este foi incubado por 6 a 18 horas no aparelho BD Phoenix 5.1<sup>®</sup>. Os procedimentos metodológicos seguintes, assim como os descritos acima foram realizados conforme as recomendações descritas pelo fabricante.

Definiu-se a CIM como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. As CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foram definidas como as menores concentrações de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de 50% e 90% das amostras, respectivamente. Os isolados foram classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes empregando os limites de sensibilidade preconizados pelo documento M100-S19 (CLSI, 2009b).

Para a validação do lote do painel e para o controle de qualidade desses testes foram incluídas as cepas controle da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

### **3.3.2. Perfil de Sensibilidade aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) e ampicilina/sulbactam pela Metodologia de Diluição em Ágar**

O teste de diluição em ágar foi realizado em todos os isolados de *Acinetobacter* spp. encaminhados pelos centros participantes ao LEMC. Após o crescimento bacteriano em placas de ágar sangue por 18 horas, uma a três colônias isoladas de *Acinetobacter* spp. foram transferidas para tubos contendo 4 mL de salina (NaCl - Sigma, St. Louis, MO). A suspensão bacteriana foi homogeneizada e a turvação medida em turbidímetro digital (Baxter<sup>®</sup>, Sacramento, EUA), para a obtenção de uma concentração bacteriana em torno de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL correspondente a 0,5 da escala de McFarland (CLSI, 2009).

As CIMs foram determinadas pela metodologia de diluição em ágar seguindo as recomendações do CLSI (CLSI, 2009a) para os seguintes antimicrobianos e respectivas diluições: imipenem (0,25-256 µg/mL), meropenem (0,25-256 µg/mL) e ampicilina/sulbactam (0,25-64 µg/mL). Esta metodologia foi realizada através da incorporação de concentrações seriadas e logarítmicas do respectivo antimicrobiano em placas de Petri individuais contendo ágar Müller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Cada placa representava uma única concentração do antimicrobiano. Foram testadas diferentes concentrações, de acordo com o antimicrobiano testado.

Após preparo e diluição do inóculo, os isolados bacterianos foram inoculados simultaneamente sobre a superfície do ágar utilizando um multi-inoculador, o qual dispensa de 1 a 3 µL contendo aproximadamente o inóculo

---

final de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. As placas inoculadas foram incubadas por 18-24 horas, a 37°C. Após este período, a CIM foi determinada como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano (CLSI, 2009a).

Como controle de qualidade dos testes de sensibilidade foram utilizadas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

### **3.3.3. PCR Multiplex em Tempo Real para Detecção de Metalo- $\beta$ -Lactamase (MBL)**

A amplificação por PCR em tempo real foi realizada em volume final de 25  $\mu$ L: 12,5  $\mu$ L de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Platinum Taq DNA polimerase, SYBR Green I dye, Tris-HCl, KCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dCTP, 800  $\mu$  dUTP, uracil DNA glicosilase, e tampão) (Invitrogen, CA), seis pares de oligonucleotídeos nas seguintes concentrações: IMPgen-F1 e IMPgen-R1 (1  $\mu$ M); VIMgen-F2 e VIMgen-R2 (0,1  $\mu$ M); GIM-F1 e GIM-R1 (0,1 $\mu$ M); SIM-F1 e SIM-R1 (0,1 $\mu$ M); SPM-F1 e SPM-F2 (0,1 $\mu$ M); 16S-8F e 16S-1493R (0,04 $\mu$ M) e 1 $\mu$ L da amostra. A termociclagem foi realizada utilizando o termociclador ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) empregando as seguintes condições: 50°C por 2 minutos e 95°C por 2 minutos (UDG), seguido de 40 ciclos a 94° C por 20 segundos; 53° C por 45 segundos; 60° C por 30 segundos. Após amplificação foi realizada curva de dissociação por meio do aquecimento dos isolados de 68°C a 95°C com aumento gradual de 0,5 C/s.

### **3.3.4. Detecção genotípica de OXA carbapenemases por Multiplex PCR**

Para detecção da presença de genes que codificam 4 sub-grupos de OXA carbapenemases (23, 24, 51 e 58) foram utilizadas isolados bacterianos com 24 horas de incubação, obtidas do subcultivo em ágar sangue (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) enriquecido com sangue de carneiro desfibrinado. Após o isolamento de colônias puras, foi feito um inóculo com aproximadamente 5 colônias em 300 µL de água MilliQ estéril, livre de DNase e RNase, e agitado vigorosamente em vórtex. Em fluxo laminar, foi preparada uma solução mãe (máster mix) contendo: 0,25 µL de cada um dos oligonucleotídeos, 10 µL de Go Taq® Green Máster Mix2X (Tampão de reação pH 8,5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub> e taq DNA Polimerase) 1 µL do inóculo e água MilliQ estéril para o volume final de 20 µL. As condições utilizadas para a reação de PCR no termociclador (Eppendorf Mastercycler, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) foram: ciclo de denaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94° C por 25 segundos; 52° C por 40 segundos; 72° C por 50 segundos. Após o último ciclo, houve uma extensão final a 72° C por 6 minutos. Após a amplificação do DNA, o produto amplificado final foi submetido à eletrofores em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e visibilizado sob luz ultravioleta.

Foram utilizadas como controle positivo da reação da PCR, cepas caracterizadas geneticamente pelo laboratório ALERTA (Universidade Federal de São Paulo- Disciplina de Infectologia – UNIFESP) como produtoras de Oxacilinas e como controle negativo uma alíquota da solução mãe sem DNA.

A diferenciação dos genes amplificados é feita de acordo com o tamanho do amplicon, pela análise do gel de agarose (Tabela 3).

**Tabela 3-** Oligonucleotídeos utilizados como iniciadores e tamanho do amplicon para a detecção dos genes codificadores de OXA carbapenemases.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência	Gene Alvo	Amplicon (pb)
OXA 23-F	GATCGCATTGGAGAACCAGA	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	501
OXA 23-R	ATTTCTGACCGCATTTCAT		
OXA 24-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	<i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>	246
OXA 24-R	AGTTGAGCGAAAAGGGATT		
OXA 51-F	TAAAGCTTTGACGCCCTTG	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	353
OXA 51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
OXA 58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	599
OXA 58-R	CCCCTCTGCGTCTACATAC		

### **3.3.5. Avaliação da Similaridade Genética pela Técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e Interpretação dos Padrões Moleculares**

Para a observação do padrão molecular das amostras clínicas de *A. baumannii* produtoras de IMP, a técnica utilizada foi a análise do DNA cromossômico pela eletroforese de campo pulsado "*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*" – PFGE (Pfaller *et al.* 1992).

Foi preparada para cada isolado de *A. baumannii*. uma suspensão bacteriana em 4 mL de caldo tríptico de soja (TSB – Oxoid, Inglaterra). Após 18-24 horas de incubação a 37°C, os tubos foram centrifugados por 15 minutos. Em seguida, o centrifugado (células) foi diluído em 1 mL de solução salina e transferido para um tubo de microcentrífuga de peso conhecido. Os tubos foram centrifugados a 15.000 rpm por aproximadamente 30 segundos e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e desprezado.

Com a finalidade de se determinar o peso do centrifugado (células), os tubos foram novamente pesados. O centrifugado foi diluído em salina na proporção de 1:1, isto é, o volume da salina em  $\mu\text{L}$  foi equivalente ao peso do centrifugado em  $\mu\text{g}$ . Um volume de 5  $\mu\text{L}$  desta suspensão celular foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  da solução tampão TEM (Tris 100 mM; pH 7,5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM; água destilada). Essa nova solução foi homogeneizada e misturada com 340  $\mu\text{L}$  de agarose ("low melt" – FMC, Rockland, USA) para a formação de pequenos blocos de géis contendo o DNA cromossômico ("plugs"). Os blocos foram incubados por um período mínimo de cinco horas em solução EC (Tris 6mM, pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,01 M ; Brij 58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato 0,2% e água destilada) com lisozima (20

mg/mL, Sigma, USA) a 37°C, a seguir os plugs foram incubados a 50°C, em 2 mL de solução ES (EDTA 0,4M, pH 9,3; Sarcosil 1,0%) contendo proteinase K (20 mg/mL, Invitrogen, Germany) numa proporção de 1:1, por um período de 12 horas. Após este período de incubação, os blocos foram lavados com solução CHEF-TE (Tris 0,1M, pH 7,5; EDTA 0,1M) e armazenados nessa solução até serem submetidos à digestão enzimática e posterior eletroforese.

Foram realizadas lavagens com tampão DNS (MgCl 1M; Tris 1 M, pH 8.0; água destilada). O DNA bacteriano foi digerido com a enzima de restrição Apal (New England Biolab, Inc., Beverly, Mass, USA - 10U por amostra), incubado por 12 a 18 horas à 37°C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, CA) e o padrão de variação da corrente elétrica ("switch time") foi de 5 a 30 segundos. A eletroforese foi realizada por 23 horas, em solução 0,5 x TBE (Tris 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA, 0,002M) à temperatura de 13°C e corrente elétrica de 200 volts (6 V/cm). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,08 µL/mL) por uma hora, descorados em água destilada por mais uma hora e fotografados sob luz ultravioleta.

A interpretação do perfil obtido foi realizada de acordo com os critérios de Tenover e colaboradores (Tenover *et al.* 1995), onde foram consideradas idênticas todas as amostras que apresentaram perfil migratório idêntico de todas as bandas. Foram consideradas semelhantes e pertencentes a um mesmo clone as amostras que apresentaram perfil migratório com diferença em até seis bandas. As amostras que apresentaram mais de seis bandas discordantes foram consideradas amostras distintas. Para a interpretação dos

padrões moleculares e seus subtipos, os representantes de cada clone foram categorizados com uma letra maiúscula e um número arábico.

Os géis de PFGE foram analisados pelo programa *BioNumerics* versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A definição da imagem das bandas foi realizada automaticamente pelo programa e depois conferida visualmente. O coeficiente de similaridade de Dice foi utilizado (Dice 1945), e o dendograma foi construído utilizando o algoritmo de análise filogenética UPGMA (“Unweighted Pair-Groups Method using arithmetic averages”) (Sneath and Sokal 1973). Os valores de otimização e tolerância utilizados para o conjunto de isolados foram de 1,0 e 1,5%, respectivamente. Um coeficiente de similaridade acima de 80% foi selecionado para definir cada cluster de isolados.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Resultados do Projeto SCOPE Brasil

Durante o período de Junho de 2007 a Julho de 2009, foram encaminhados ao LEMC um total de 1.787 patógenos isolados provenientes de hemocultura, onde 212 desses isolados foram *Acinetobacter* spp, sendo o terceiro patógeno mais isolado (Tabela 4) . Entre os patógenos Gram negativos, *Acinetobacter* spp. foi o segundo patógeno mais isolado, conforme descrito na Tabela 5.

**Tabela 4.** Principais patógenos<sup>a</sup> isolados em hemoculturas de pacientes admitidos em hospitais brasileiros, em comparação com dados do programa SCOPE Norte-Americano (Projeto SCOPE Brasil, junho 2007 – julho 2009).

Microrganismo	N° isolados (%)	
	Brazilian SCOPE (2007-2009)	SCOPE Norte-Americano (1995-2002)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	267 (14,9)	1.006 (4,8)
SCN <sup>b</sup>	217 (12,1)	6.566 (31,3)
<i>Acinetobacter</i> spp	212 (11,8)	272 (1,3)
<i>Staphylococcus aureus</i>	208 (11,6)	4.237 (20,2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	175 (9,8)	902 (4,3)
<i>Escherichia coli</i>	130 (7,3)	1.174 (5,6)
<i>Enterococcus</i> spp.	118 (6,6)	1.971 (9,4)
<i>Enterobacter</i> spp.	97 (5,4)	818 (3,9)
<i>Candida</i> spp.	87 (4,9)	1.888 (9,0)
<i>Serratia</i> spp.	69 (3,9)	356 (1,7)
Número total de isolados	1787 (100)	20.978 (100)

a Um ou mais microrganismos por paciente; <sup>b</sup>SCN = *Staphylococcus* coagulase negativo

**Tabela 5.** Patógenos Gram negativos mais frequentemente isolados em hemoculturas de pacientes admitidos em hospitais brasileiros (Projeto SCOPE Brasil junho 2007- julho 2009).

Microrganismo	Número isolados (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	267 (24,0)
<i>Acinetobacter</i> spp	212 (19,0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	175 (15,8)
<i>Escherichia coli</i>	130 (11,7)
<i>Enterobacter</i> spp.	97 (8,7)
<i>Serratia</i> spp.	69 (6,2)
<i>Proteus mirabilis</i>	34 (3,1)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	19 (1,8)
<i>Burkholderia cepacia</i>	16 (1,4)
<i>Citrobacter</i> spp.	15 (1,3)
Outros <sup>a</sup>	78 (7,0)
N° total de isolados Gram negativos	1112

<sup>a</sup> Inclue: *Actinobacillus lignieresii*; *Aeromonas hydrophyla*; *Alcaligenes faecalis*; *Brevundimonas diminuta*; *Chryseobacterium gleum*; *Chryseobacterium indologenes*; *Hafnia alvei*; *Klebsiella oxytoca*; *Kluyvera ascorbat*; *Methylobacterium* spp.; *Moraxella* spp.; *Morganella morganii*; *Pantoea agglomerans*; *Providencia stuartii*; *Pseudomonas fluorescens*; *Pseudomonas putida*; *Pseudomonas stutzeri*; *Ralstonia picketti*; *Salmonella* spp.;

#### **4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de Diluição em Ágar**

Durante o período de Junho de 2007 à Julho de 2009, foram encaminhadas ao LEMC um total de 212 isolados de *Acinetobacter* spp., dentre os quais seis não foram recuperados em cultura devido a não viabilidade no momento do recebimento, ou presença de contaminação com outro tipo de colônia bacteriana. Os 206 isolados viáveis foram submetidos à técnica de diluição em ágar para os carbapenêmicos imipenem e meropenem, e para ampicilina/sulbactam, com o objetivo de obter os valores de CIM, uma vez que os centros participantes enviam os resultados apenas por categoria de sensibilidade.

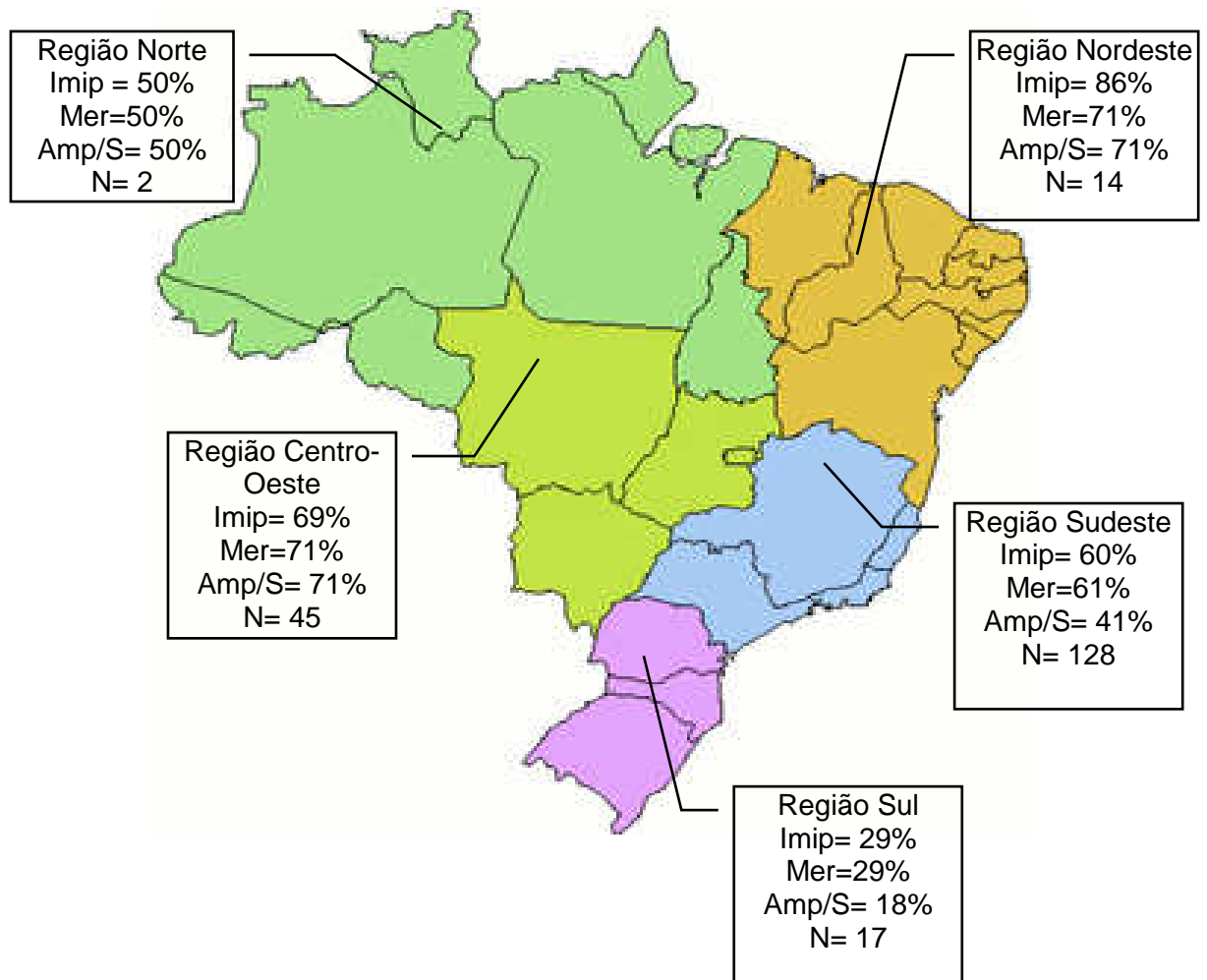
Como pode ser observado na Tabela 7, altos níveis de resistência a imipenem (CIM<sub>50</sub> 64 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 256), meropenem (CIM<sub>50</sub> 32 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 256 µg/mL) e ampicilina/sulbactam (CIM<sub>50</sub> 8 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 64 µg/mL) foram observados entre os isolados.

Dos 206 isolados de *Acinetobacter* spp. encaminhados ao LEMC, que foram submetidos a diluição em ágar, 80 (39%) apresentaram perfil de sensibilidade para imipenem, 76 (37%) para meropenem, e 113 (55%) para ampicilina/sulbactam. Entretanto, 126 (61%) isolados apresentaram resistência para imipenem, 130 (63%) para meropenem e 93 (45%) para ampicilina/sulbactam, demonstrando que a resistência para os carbapenêmicos esteve presente em mais da metade dos isolados. Os resultados demonstraram que a resistência a ampicilina/sulbactam foi muito alta, porém ainda se encontra abaixo da resistência aos carbapenêmicos.

**Tabela 6.** Descrição do perfil de sensibilidade e resistência através da metodologia de diluição em ágar dos isolados de *Acinetobacter* spp. por região do país.

Região	Imipenem				Meropenem			Ampicilina/Sulbactam		
	N	R	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	R	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	R	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
Norte	2	50%	-	-	50%	-	-	50%	-	-
Nordeste	14	86%	128	256	71%	64	256	71%	16	64
Centro-Oeste	45	69%	64	256	80%	128	256	58%	16	32
Sul	17	29%	1	32	29%	2	128	18%	0,5	32
Sudeste	128	60%	64	256	61%	64	256	42%	32	64
<b>Total</b>	<b>206</b>	<b>61%</b>	<b>64</b>	<b>256</b>	<b>63%</b>	<b>32</b>	<b>256</b>	<b>45%</b>	<b>8</b>	<b>64</b>

- Não consta valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, para a Região Norte, pois foram enviados apenas dois isolados de *Acinetobacter* spp.



**Figura 2-** Perfil de resistência aos carbapenêmicos imipenem e meropenem e ampilicina/sulbactam de 206 isolados de *Acinetobacter* spp. distribuídos por região do país. Imip: Imipenem; Mer: Meropenem; Amp/S: Ampicilina/Sulbactam.

### 4.3. PCR Multiplex em Tempo Real para Detecção de Metallo- $\beta$ -Lactamase (MBL)

Entre os 206 isolados de *Acinetobacter* spp. que foram submetidos a técnica de diluição em ágar, 130 (63%) apresentaram um resultado de CIM  $\geq$  8  $\mu$ g/mL para imipenem e/ou meropenem, e foram selecionadas para a pesquisa de genes de M $\beta$ L através da técnica de Multiplex PCR em Tempo Real para os genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>.

Apenas o gene *bla*<sub>IMP</sub> foi detectado em 24 amostras (18%) das 130 resistentes aos carbapenêmicos, de 5 centros diferentes, sendo 3 da região sudeste, 1 da região nordeste e 1 da região centro-oeste, demonstrando a disseminação desse gene entre os estados brasileiros. Esses resultados estão descritos na Tabela 7 e Tabela 8.

**Tabela 7.** Freqüência dos isolados de *Acinetobacter* spp resistentes aos carbapenêmicos que apresentaram gene *bla*<sub>IMP</sub>. distribuídos por centro participante e região o país.

Centro	Região	N (%)	M $\beta$ L
1	Sudeste	14(11%)	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>
2	Sudeste	2(1,6%)	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>
5	Sudeste	2(1,6%)	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>
9	Nordeste	4(3%)	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>
13	Centro-Oeste	2(1,6%)	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>
Total		24 (18%)	

**Tabela 8.** Resultados dos isolados que apresentaram o gene *bla*<sub>IMP</sub> distribuídos por Centro, região e seus valores de CIM (µg/mL)

Amostra	Centro	Região	MβL	CIM Imipenem (µg/mL)	CIM Meropenem (µg/mL)
29761	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	256	128
30612	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	256	128
30766	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	16	8
31721	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
31967	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	>256	256
32634	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	>256	128
33109	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	>256	128
33484	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
34391	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
34568	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
35952	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	64	128
36609	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
37206	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	16
37795	1	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
34799	2	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
34830	2	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
33911	5	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
34049	5	Sudeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
33211	9	Nordeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	64
35757	9	Nordeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
35758	9	Nordeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
35760	9	Nordeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	128	256
37117	13	Centro-Oeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	0,5	8
38036	13	Centro-Oeste	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	64	128

#### 4.4. PCR Multiplex para detecção de genes codificadores de OXA

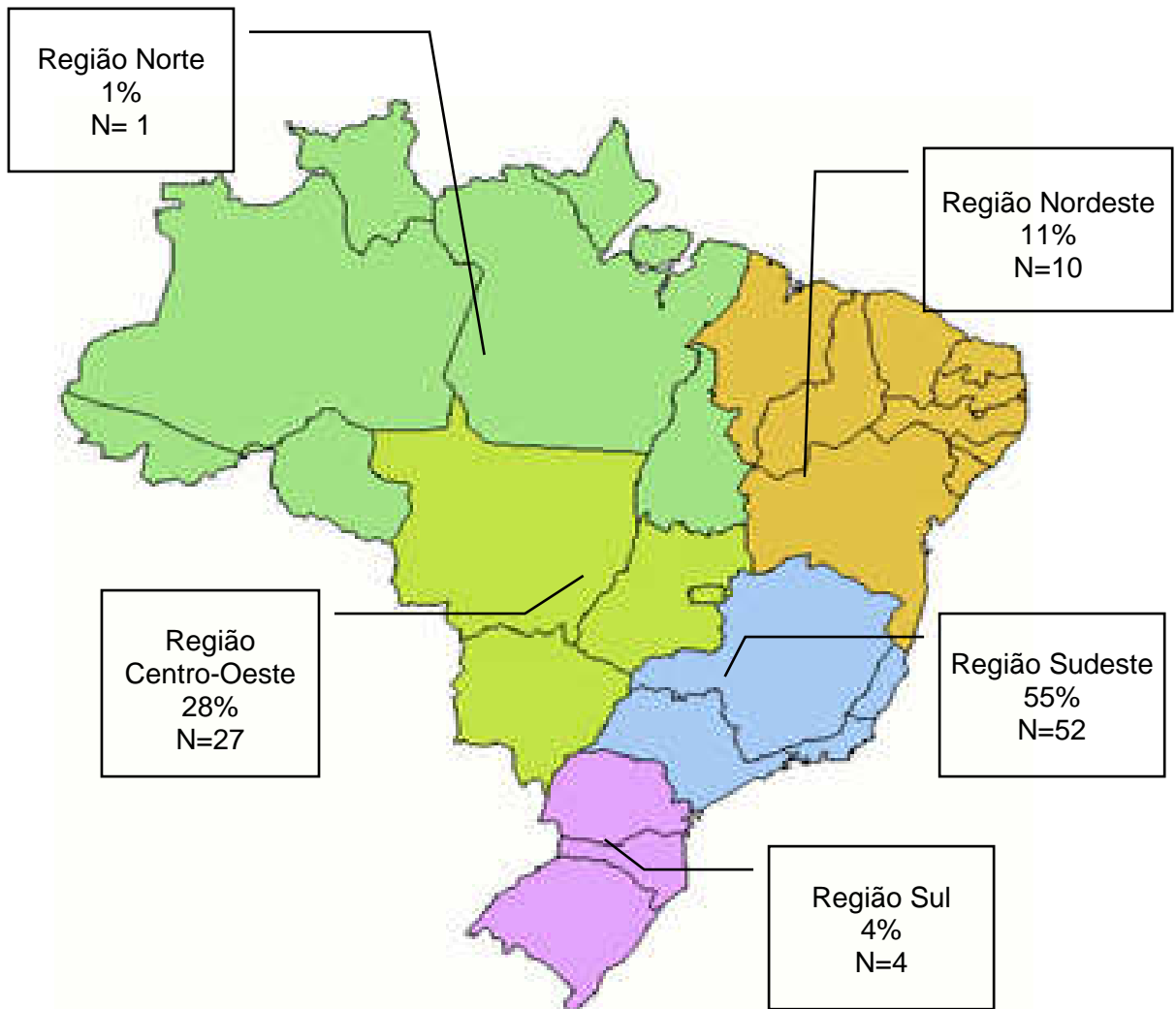
Entre os 130 isolados que apresentaram um resultado de CIM  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$  para imipenem e/ou meropenem, 127 foram da mesma forma selecionados para a pesquisa de genes oxacilinasés através da técnica de Multiplex PCR para os genes *bla*<sub>OXA23</sub>-like, *bla*<sub>OXA24</sub>-like *bla*<sub>OXA51</sub>-like *bla*<sub>OXA58</sub>-like, uma vez que 3 dos isolados não foram mais recuperados em cultura.

Entre os 127 isolados, 94 (74%) apresentaram o gene de resistência *bla*<sub>OXA23</sub>-like e o gene *bla*<sub>OXA51</sub>-like. O gene *bla*<sub>OXA23</sub>-like está relacionado com a resistência aos carbapenêmicos, enquanto o gene *bla*<sub>OXA51</sub>-like é constitutivo do cromossomo de *A. baumannii*. Apenas 26 (20%) dos isolados apresentaram somente o gene *bla*<sub>OXA51</sub>-like, e todos esses foram identificados como *A. baumannii* demonstrando mais uma vez que este gene está relacionado somente com essa espécie, e 7 (5,5%) isolados não apresentaram o gene *bla*<sub>OXA51</sub>-like e foram re-identificados como 5 *A. lwoffii*, 1 *Actinobacillus lignieressi* e 1 *Burkholderia cepacia*. Esses resultados estão descritos na Tabela 8, e a distribuição de OXA23 por região do país está descrita na Figura 3.



**Tabela 9.** Resultados da pesquisa dos genes codificadores de OXA em isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos distribuídos por Região do país.

Região	N Total	Amostras Resistentes		OXA23 + OXA51+		OXA23 – OXA51 +		OXA23 – OXA51 -	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Norte	2	1	50	1	100	0	0	0	0
Nordeste	14	11	79	10	91	0	0	1	33
Centro-Oeste	45	34	76	27	79	6	18	1	3
Sul	17	5	29	4	80	0	0	1	20
Sudeste	128	76	59	52	68	20	26	4	5
<b>Total</b>	<b>206</b>	<b>127</b>	<b>62</b>	<b>94</b>	<b>74</b>	<b>26</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>6</b>



**Figura 3.** Distribuição do gene *bla*<sub>OXA23</sub>-like nos isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos entre as regiões do país.

---

#### 4.5. Avaliação da Similaridade Genética pela Técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

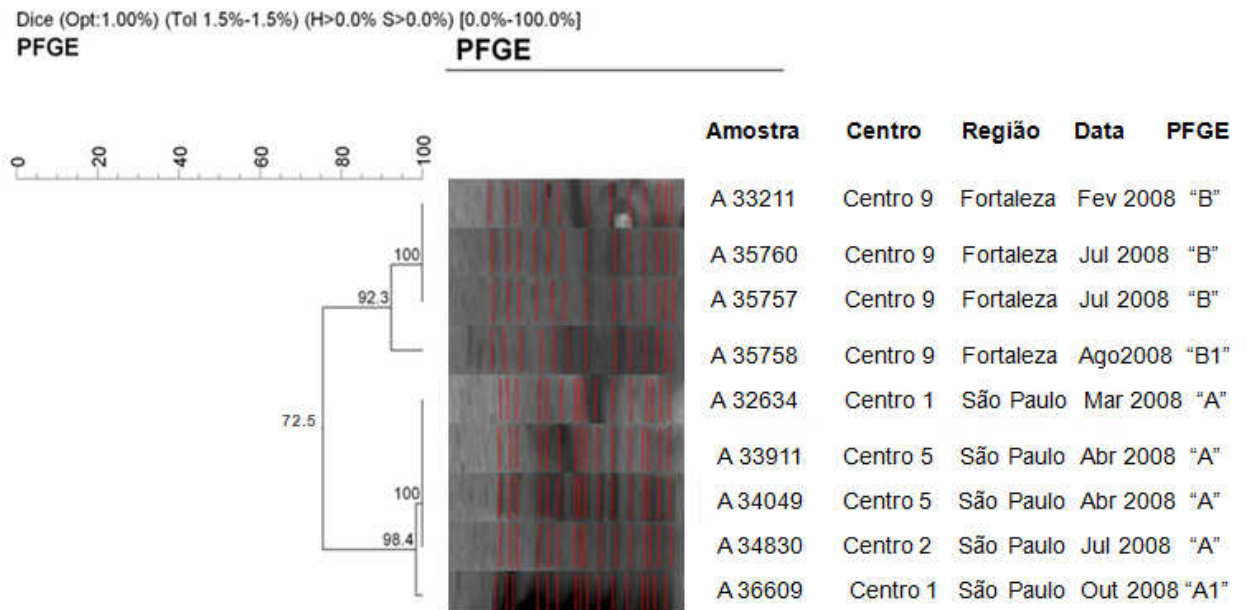
Um total de 13 isolados de *Acinetobacter* spp foram selecionados para a avaliação de similaridade genética pela técnica de PFGE. Desses isolados, seis apresentaram os genes *bla<sub>IMP</sub>* e *bla<sub>OXA23</sub>-like*, os outros 7 isolados apresentaram somente o gene *bla<sub>IMP</sub>*, sendo 4 isolados provenientes de um centro em Fortaleza, representando a região Nordeste, 2 isolados de Brasília representando a região Centro-Oeste, 7 isolados de 3 centros em São Paulo representando a região sudeste.

Dentre os isolados do mesmo centro de Fortaleza, três apresentaram o mesmo padrão de PFGE, denominado “B”, e um isolado foi considerado um subtipo, denominado “B1”. Estes isolados foram agrupados em um mesmo “cluster”, apresentando similaridade genética de mais de 90% entre si, mas não apresentando similaridade significativa com os outros isolados do outro estado

Dentre os sete isolados provenientes de três centros de São Paulo, quatro receberam o mesmo padrão de PFGE, denominado “A”, um isolado foi considerado um subtipo, denominado “A1”. Estes isolados foram agrupados em um mesmo “cluster”, apresentando similaridade genética de mais de 90% entre si, mas não apresentando similaridade significativa com os outros isolados do outro estado.

Dois isolados do centro participante de Brasília e dois isolados de centros diferentes de São Paulo não foram tipados, pois sofreram degradação do DNA tornando-se necessária a posterior repetição do experimento.

Os resultados obtidos pela técnica de PFGE estão demonstrados na Figura 4, onde é observado o dendrograma com a formação de dois principais clusters e a determinação do padrão de PFGE segundo Tenover (1995).



**Figura 4.** Dendrograma dos perfis do PFGE através dos isolados de *Acinetobacter baumannii*. resistentes aos carbapenêmicos e carreadores do gene *bla<sub>IMP</sub>* provenientes de centros de diferentes regiões geográficas brasileiras (Programa *BioNumerics* versão 5.0).

## 5. DISCUSSÃO

No estudo do Projeto SCOPE Brasil foi observado que os bacilos Gram negativos foram responsáveis por 62,2% das ICS e os cocos Gram positivos por 32%. Entre os principais microrganismos isolados durante o período de junho de 2007 a julho de 2009, *K. pneumoniae* (14,9%) foi o patógeno mais freqüente, seguido de SCN (12,1%), e o *A. baumannii* (11,8%) foi o terceiro patógeno mais isolado, sendo o segundo microrganismo Gram negativo mais freqüente. No estudo SCOPE americano o *Acinetobacter* spp. foi o décimo patógeno mais isolado, sendo o sexto microrganismo Gram negativo mais freqüente. Esses dados são confirmatórios da maior prevalência de isolados de bacilos Gram negativos em relação aos Cocos Gram positivos em infecções de corrente sanguínea em nosso meio em comparação com achados Norte-americanos.

Dos 206 isolados de *Acinetobacter* spp., 126 (61%) apresentaram resistência a imipenem, 130 (63%) a meropenem e 93 (45%) a ampicilina/sulbactam. O valor elevado das CIMs, imipenem (CIM<sub>50</sub> 64 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 256), meropenem (CIM<sub>50</sub> 32 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 256) e ampicilina/sulbactam (CIM<sub>50</sub> 8 µg/mL e CIM<sub>90</sub> 64) caracterizam da mesma forma essas altas taxas de resistência.

No estudo do projeto SENTRY, com isolados de 2003 a 2008, a taxa de resistência para imipenem e meropenem foi de 23,5% e 24,4% respectivamente, e os valores de CIM foram para imipenem CIM<sub>50</sub> 1µg/mL e CIM<sub>90</sub> >8 µg/mL, e para meropenem CIM<sub>50</sub> 2 µg/mL e CIM<sub>90</sub> >8µg/mL (Andrade *et al.*, 2008).

---

Vários estudos ao longo dos últimos anos mostram o aumento da resistência aos carbapenêmicos em hospitais brasileiros (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Gales *et al.*, 2003; Sader *et al.*, 2005). É provável que o aumento dessa resistência esteja relacionado com o do uso de antimicrobianos de amplo espectro em tratamentos de infecções hospitalares por microrganismo Gram negativos multirresistentes, principalmente após o aumento de produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, onde o aumento do uso de carbapenêmicos tornou-se necessário, surgindo assim as carbapenemases. (Koeleman *et al.*, 1997; Nordmann *et al.*, 2009; Zarrili *et al.*, 2004).

Um estudo brasileiro avaliou a eficácia do uso de ampicilina/sulbactam em pacientes que apresentaram infecções causadas por *A. baumannii* multirresistentes concluindo como sendo uma opção segura e eficaz (Levin *et al.*, 2003). Entretanto, um estudo realizado por Michalopoulos e Falagas na Grécia, onde foi comparada a eficácia dos antimicrobianos disponíveis para tratamento de *A. baumannii* multirresistente, não foi estabelecido um tratamento ideal para essas infecções (Michalopoulos e Falagas, 2010).

Ao analisar os dados obtidos em diferentes regiões geográficas brasileiras, foi encontrado um perfil diferente entre elas. A região Sul, embora não tenha encaminhado um grande número de isolados, onde apenas um centro enviou amostras, foi a região que demonstrou menor taxa de resistência com 29% de resistência a imipenem e meropenem, e 18% de resistência a ampicilina/sulbactam.

Ao contrário, a região que demonstrou a maior taxa de resistência aos antimicrobianos testados foi a região Nordeste, onde 4 centros participaram do estudo, e 3 enviaram isolados de *Acinetobacter* spp. As taxas de resistência

dos isolados da região Nordeste para imipenem foram de 86%, e para meropenem e ampicilina/sulbactam 70%. Na região Sudeste a taxa de resistência a imipenem foi de 60%, 61% para meropenem e 41% para ampicilina/sulbactam. A região Centro-Oeste apresentou resultados semelhantes ao Sudeste, com 69% dos isolados resistentes a imipenem, 80% a meropenem e 58% a ampicilina/sulbactam.

Essa diferença no perfil de sensibilidade entre as diferentes regiões do país poderia ser explicada por diferenças entre os hospitais e de seus pacientes, além de disseminação clonal de bactérias carreadoras de genes de resistência no hospital, entre hospitais da mesma cidade e entre hospitais de diferentes regiões brasileiras.

Para pesquisa de MBL em PCR em tempo real foram selecionados 130 isolados de *Acinetobacter* spp. que apresentaram CIM  $\geq 8\mu\text{g/mL}$  por diluição em Agar, para imipenem e/ou meropenem.

Foram pesquisados os genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, e 24 (18%) dos isolados apresentaram o gene *bla*<sub>IMP</sub>. Alguns estudos com *Acinetobacter* spp. demonstraram resultados semelhantes como o de Niumsup e colaboradores. (2009) que encontraram 15% dos isolados com o gene *bla*<sub>IMP</sub> em um hospital regional no norte da Tailândia (Niumsup *et al.*, 2009). Em estudo com isolados de *Acinetobacter* spp. de 3 hospitais universitários na Coreia, o gene *bla*<sub>IMP</sub> foi detectado em 48,4% (Sung *et al.*, 2008).

No Brasil, em um estudo feito no Hospital São Paulo, com 73 isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos no período de 1993 a 2001, não houve detecção de MBL até 1997. Entretanto, em 1998, 29% eram produtores de MBL do tipo IMP-1 (Tognim *et al.*, 2006). Entretanto, em estudo

---

realizado na cidade do Rio de Janeiro com 110 isolados de 8 hospitais, no período de janeiro de 2006 a setembro de 2007, não foi encontrado o gene *bla<sub>IMP</sub>* entre os isolados pesquisados (Carvalho *et al.*, 2009).

Dos 24 isolados do presente estudo, apenas um apresentou CIM para imipenem de 16 µg/mL e 8 µg/mL para meropenem, os demais apresentaram resultado de no mínimo CIM 64 µg/mL, sendo que 14 (58%) apresentaram CIM 128µg/mL para imipenem e CIM 256µg/mL para meropenem.

Da mesma maneira, em estudo realizado em quatro hospitais na cidade de São Paulo o valor da CIM >128µg/mL foi observada nos isolados produtores de MβL do tipo IMP-1, caracterizando um valor maior quando comparado com os isolados que não possuíam o gene codificador dessa enzima (Mostachio, 2009).

Os isolados que apresentaram o gene *bla<sub>IMP</sub>* são provenientes de três regiões brasileiras, sendo 18 (75%) isolados da região Sudeste, distribuídas entre 3 centros participantes, 4 isolados (17%) da região Nordeste, de apenas um centro participante, e 2 (8%) isolados da região Centro-Oeste. A região Sudeste foi a mais representativa em número de isolados, sendo ao todo 128 isolados de *Acinetobacter* spp. encaminhados ao LEMC, onde 78 foram resistentes aos carbapenêmicos, e, portanto, com maior probabilidade de detecção dos mecanismos de resistência pesquisados.

Embora as regiões Nordeste e Centro-Oeste tenham encaminhado um número menor de isolados, esses demonstraram um alto nível de resistência aos carbapenêmicos com resultados de CIM muito altos, particularmente na região Nordeste onde em um centro foi identificado este gene de resistência, sugerindo a possibilidade de um surto nesse hospital.



---

Em um estudo com 44 isolados de *A. baumannii* em Singapura, apenas 4 apresentaram o gene *bla*<sub>IMP-4</sub> demonstrando que esse mecanismo de resistência está disseminado em várias partes do mundo, porém não parece ser o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp (Koh *et al.*, 2007).

Dos mesmos 130 isolados que foram submetidos à pesquisa de M $\beta$ L, 127 foram também submetidos a pesquisa de genes codificadores de OXA por PCR Multiplex para os genes *bla*<sub>OXA23-like</sub>, *bla*<sub>OXA24-like</sub>, *bla*<sub>OXA51-like</sub>, *bla*<sub>OXA58-like</sub>, 3 isolados não foram mais viáveis em cultura.

Um total de 94 (73%) dos isolados apresentaram os genes *bla*<sub>OXA23-like</sub> e *bla*<sub>OXA51-like</sub>, sendo que 52 (41%) dos isolados são provenientes da região Sudeste, 10 (8%) da região Nordeste, 4 (2%) da região Sul, 27 (21%) da região Centro-Oeste e 1 (1%) da região Norte.

Nas regiões Sudeste e Centro-Oeste foram detectados isolados somente com gene *bla*<sub>OXA51-like</sub>, com 20 (16%) e 6 (5%) isolados respectivamente.

No estudo de Carvalho e colaboradores com 110 isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos em sete hospitais no Rio de Janeiro, os resultados apresentados foram semelhantes aos do presente estudo, onde 96 (87,3%) apresentaram o gene *bla*<sub>OXA23-like</sub> (Carvalho *et al.*, 2009). Um estudo realizado em hospital universitário em Seul na Coréia, 100% dos 49 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos apresentaram os genes *bla*<sub>OXA23-like</sub> e *bla*<sub>OXA51-like</sub>, sendo evidenciada disseminação clonal no hospital (Yang *et al.*, 2009).

Todos os isolados que apresentaram os genes *bla*<sub>OXA23-like</sub> e *bla*<sub>OXA51-like</sub> foram identificados como *A. baumannii* demonstrando que o gene *bla*<sub>OXA51-like</sub>

---

é provavelmente intrínseco dessa espécie, fazendo parte do seu cromossomo, como já descrito na literatura (Heritier *et al.*, 2005; Woodford *et al.*, 2006).

Dos 94 isolados que apresentaram a presença do gene *bla*<sub>OXA23</sub>-like, 39% apresentaram CIM 64µg/mL para imipenem, e 41% CIM 128µg/mL para meropenem, demonstrando um aumento significativo dos valores da CIM em isolados que possuem gene *bla*<sub>OXA23</sub>-like, assim como os que apresentaram o gene *bla*<sub>IMP</sub>.

As amostras que não apresentaram os genes *bla*<sub>OXA23</sub>-like e *bla*<sub>OXA51</sub>-like foram identificados como: 5 *Acinetobacter lwoffii*; 1 *Actinobacillus lugnieresii*; 1 *Burkholderia cepacia*, mais uma vez demonstrando que o gene *bla*<sub>OXA51</sub>-like é intrinsecamente pertencente ao *A. baumannii*.

Entre os isolados submetidos à pesquisa de genes codificadores de MβL e OXA, 6 apresentaram o gene *bla*<sub>IMP</sub> em conjunto com os genes *bla*<sub>OXA23</sub>-like e *bla*<sub>OXA51</sub>-like, resultados que concordam com estudo realizado na Coreia, onde foi encontrado produção de OXA-2 e IMP-4 em isolados de *A. baumannii*, demonstrando associação de diferentes mecanismos de resistência enzimática no mesmo isolado (Sung *et al.*, 2008). Do mesmo modo já foi relatado um isolado de *A. junii* na Austrália, que possuía a presença de genes de OXA-58 e IMP-4 (Peleg *et al.*, 2006). Desses 6 isolados, 4 foram provenientes da região Nordeste e 2 da região Centro-Oeste, regiões com maior índice de resistência aos carbapenêmicos.

Para os isolados que não apresentaram a presença de genes de OXA ou MβL pesquisados, outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos, como produção de outras enzimas carbapenemases, hiperexpressão de bomba de efluxo ou perda de permeabilidade de membrana externa (Limansky *et al.*,

2002; Peleg, Seifert e Paterson, 2008). A produção de GES-11, uma ES $\beta$ L com atividade de carbapenemase, já foi descrita em *A. baumannii* e pode também ser responsável pelo fenótipo de resistência nestes microrganismos (Moubareck *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos através da técnica de PFGE demonstraram que os isolados provenientes do centro de Fortaleza fazem parte de um mesmo clone. Esses isolados apresentaram os genes *bla<sub>IMP</sub>* e *bla<sub>OXA23-like</sub>* e são provenientes de hemoculturas coletadas entre os meses de fevereiro de 2008 a agosto de 2008, e demonstram fazer parte de um clone predominante nesse hospital durante este período. Entretanto esses isolados não possuem similaridade genética com os isolados da cidade de São Paulo.

Da mesma maneira, os resultados dos cinco isolados de três centros participantes da cidade de São Paulo, demonstraram ser fortemente relacionados fazendo parte de um mesmo clone, e só apresentaram o gene *bla<sub>IMP</sub>* e foram isolados no período de março de 2008 a outubro de 2008. Esses resultados demonstram disseminação inter-hospitalar de um mesmo clone, uma vez que são provenientes de três hospitais diferentes na mesma cidade.

Entretanto não foi observada uma similaridade genética significativa entres os isolados de diferentes estados brasileiros, demonstrando nesse caso não haver disseminação clonal desses isolados carregando o gene *bla<sub>IMP</sub>* entre estados brasileiros.

Em um estudo na cidade de Curitiba com isolados de *A. baumannii* com a presença do gene *bla<sub>OXA23</sub>*, foi observado três grupos distintos de perfis de PFGE (Schimith *et al.*, 2010). Entretanto em outro estudo no estado do Paraná

houve predominância de um mesmo clone entre dois hospitais na cidade de Ponta Grossa (Dalla-Costa *et al.*, 2003).

O fato dos isolados de nosso estudo terem sido recuperados do primeiro episódio de ICS caracterizado como infecção hospitalar, alerta sobre a importância de programas de vigilância e de uso racional de antimicrobianos, uma vez que foram constatados altos índices de resistência aos carbapenêmicos, diminuindo consideravelmente as opções de tratamento dessas infecções.

O estudo de isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes da continuação do Projeto SCOPE Brasil deverá complementar os dados obtidos do presente estudo incluindo a sensibilidade a outros antimicrobianos.

## 6. CONCLUSÕES

- Foram encontradas altas taxas de resistência de *Acinetobacter* spp aos antimicrobianos carbapenêmicos e ampicilina-sulbactam com diferenças entre as regiões geográficas brasileiras
- A presença do gene *bla<sub>IMP</sub>* foi detectada em 18% dos 130 isolados estudados.
- O gene *bla<sub>OXA23</sub>*-like foi encontrado em 74% (94) dos isolados estudados.
- Um total de 6 isolados apresentaram os genes *bla<sub>IMP</sub>* e *bla<sub>OXA23</sub>*-like associados.
- Foi observada disseminação clonal em um hospital na cidade de Fortaleza nos isolados que carregavam o gene *bla<sub>IMP</sub>* caracterizando um provável surto.
- Foi observada disseminação clonal inter-hospitalar na cidade de São Paulo entre os isolados que apresentaram o gene de resistência aos carbapenêmicos, porém não foi observada disseminação entre diferentes regiões brasileiras.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afzal-Shah, M.; Woodford, N.; Livermore, D. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D  $\beta$ -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45:583-8.

Ambler,RP. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci*. 1980; 289:321-31.

Andrade, SS; Sader, HS; Barth, AL;Ribeiro, J; Zoccoli, C; Pignatari, ACC; Gales, AC. Antimicrobial susceptibility of Gram negative bacilli isolate in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2003-2008).*Braz J Infect Dis*. 2008; 12 Suppl 2, 3-9.

Baumann, P; Doudoroff, M; Stanier, RY. A Study of the Moraxella Group II. Oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol*. 1968; 95:1520-41.

Bergogne-Bérézin, E, Towner, KJ. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clin Microbiol Rev*. 1996; 9:148-65.

Bou G, Martinez-Beltran J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:428-32.

Bouza, E, San Juan, R, Munoz, P, Voss,A. and Kluytmans,J. A European perspective on nosocomial urinary tract infections II. Report on incidence, clinical characteristics and outcome (ESGNI-004 study). European Study Group on Nosocomial Infection. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7:532-42.

Bradford, PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct;14(4):933-51.

Brink, AJ. Moolman, M; da Silva, C.. Botha M. Antimicrobial susceptibility profile of selected bacteraemic pathogens from private institutions in South Africa. *S Afr Med J*. 2007; 97:273–279.

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

Bryan,CS; Reynolds,KL; Brenner,ER. Analysis of 1,186 episodes of gram-negative bacteremia in non-university hospitals: the effects of antimicrobial therapy. *Rev. Infect. Dis.* 1983; 5:629-38.

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

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

Bush,K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32:1085-89.

Carvalho, KR; Carvalho-Assef, AP; Peirano, G.; Santos, LC; Pereira, MJ; Asensi, MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla (OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34(1):25-8.

Castanheira, M; Toleman, MA; Jones, RN; Schmidt, FJ; Walsh, TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, bla<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004; 48 (12): 4654-4661.

Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for Control of Infections with Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Acute Care Facilities. *MMWR* 2009;58:256-260.

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

Cisneros, JM; Rodriguez-Bano, J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8(11):687-93.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Seventh Edition: Approved Standard M02-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Approved Standard M02-A10. (2009a).

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Approved Standard M100-S19. (2009b).

Coelho, J; Woodford, N; Afzal-Shah, M.; Livermore, D. Occurrence of OXA-58-símile carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50:756–8.

Collin, BA; Leather, HL; Wingard, JR; Ramphal, R. Evolution, incidence, and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33:947-53.

Corvec, S; Caroff, N; Espaze, E; Giraudeau, C; Drugeon, H; Reynaud, A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:629-35.

Dalla-Costa, LM; Coelho, JM; Souza, HA; Castro, ME; Stier, KL *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:3403-6.

Damier-Piolle, L.; Magnet, S.; Bre'Mont, S.; Lambert, T.; Courvalin P.. Adel JK, a Resistance-Modulation-Cell Division Pump Effluxing Multiple Antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52, 557–562, 2008.

Danes, C; Navia, MM; Ruiz, J; Marco, F; Jurado, A, Jimenez de Anta, MT *et al.* Distribution of  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (AmpC inhibitor) on the MICs of different beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50:261-4.

Del Mar Tomas, M; Cartelle, M; Pertega, S; Beceiro, A; Llinares, P; Canle, D; Molina, F; Villanueva, R; Cisneros, JM; Bou, G. Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain



of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonization and infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 2005, 11(7): 540-46.

Dice L.R. (1945) Measures of the amount of ecological association between species. pp. 297-302.

Diekema, DJ; Pfaller, MA. Infection control epidemiology and clinical microbiology. In: Manual of Clinical Microbiology By Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 9 ed. American Society for Microbiology - ASM, Washington, DC, 2007; 1:698-715.

Donald, HM *et al.* Sequence Analysis of ARI-1, a Novel OXA  $\beta$ -Lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(1):196-9.

Dupont, MJ; Pages, M; Lafitte, D; Siroy, A; Bollet, C. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Proteome Research*, 2005, 4: 2386-2390.

Erbay, A; Idil, A; Gözel, MG; Mumcuoğlu, I; Balaban, N. Impact of early appropriate antimicrobial therapy on survival in *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Dec;34(6):575-9.

Falagas, ME *et al.* Trends in antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from hospitalised patients in Greece and treatment implications. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13:816-19.

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

Fournier, PE; Richet, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis.* 2006; 42(5):692-9.

Friedland, I; Stinson, L; Ikaidi, M; Harm, S; Woods, GL. Resistance in Enterobacteriaceae: results of a multicenter surveillance study, 1995-2000. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2003; 24:607-612.

Gales, AC; Jones, RN; Forward, KR; Linares, J; Sader, HS; Verhoef, J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin Infect Dis*. 2001; 32 Suppl 2:S104-S113.

Gales, AC; Menezes, LC; Silbert, S; Sader, HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *Journal Antimicrobial Chemother*, 2003; 52 (4): 699-702.

Gales, AC; Tognim, MC; Reis, AO; Jones, RN; Sader, HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45:77-9.

Gatell, JM; Trilla, A; Latorre, X; Almela, M; Mensa, J; Moreno, A; Miro, JM; Martinez, JA; Jimenez de Anta, MT; Soriano, E. Nosocomial bacteremia in a large Spanish teaching hospital: analysis of factors influencing prognosis. *Rev. Infect. Dis*. 1988; 10:203-10.

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

Gniadkowski, M. Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clin. Microbiol. Infect*. 2008; 14 Suppl 1:11-32.

Go, ES; Urban, C; Burns, J; Kreiswirth, B; Eisner, W; Mariano, N; Mosinka-snipas, K; Rahal, JJ. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet*, 1994; 344(8933):1329-32.

Goossens, H; Grabein, B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005 Dec;53(4):257-64.

Gundi, VAKB; 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.*, 2009; 155:2333.

Hendrickx, L; Hausner, M; Wuertz, S. Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* sp. strain BD413 biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69:1721–27.

Héritier, C; Poirel, L; Aubert, D; Nordmann, P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(1):268-73.

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

Hernandez-Alles, S; Alberti, S; Alvarez, D; Domenech-Sanchez, A; Martinez-Martinez, L; Gil, J; Tomas, JM; Benedi, VJ. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* 1999; 145(Pt 3):673-9.

Higgins, PG; Wisplinghoff, H; Stefanik, D et al. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54: 821–3.

Hirakata, Y; Izumikawa, K; Yamaguchi, T; Takemura, H; Tanaka, H; Yoshida, R; Matsuda, J; Nakano, M; Tomono, K; Maesaki, S; Kaku, M; Yamada, Y; Kamihira, S; Kohno, S. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42:2006-11.

Hong, H; Patel, DR; Tamm, LK; van den Berg, B. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel. *J Biol Chem.* 2006; 281(11):7568-77.

Jang, TN; Lee, SH; Huang, CH; Lee, CL; Chen, WY. Risk factors and impact of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in the adult intensive care unit: a case-control study. *J Hosp Infect.* 2009 Oct;73(2):143-50.

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

Jones, RN. Important and emerging  $\beta$ -lactamase-mediated resistances in hospital-based pathogens: the AmpC enzymes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998; 31(3):461-6.

Jones, RN; Deshpande, L; Fritsche, TR; Sader, HS. Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in the MYSTIC Programme (USA, 1999–2003). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 49:211–6.

Kanemoto, K; Ogawa, R; Kurishima, K; Ishikawa, H; Ohtsuka, M; Sekizawa, K. Severe community-acquired *Acinetobacter* pneumonia. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2003; 41:817-21.

Koeleman, JG *et al.* Nosocomial outbreak of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a surgical ward: epidemiology and risk factors for acquisition. *J Hosp Infect.* 1997 Oct;37(2):113-23.

Koeleman, JG; van der Bijl, MW; Stoof, J; Vandenbroucke-Grauls, CM; Savelkoul, PH. Antibiotic resistance is a major risk factor for epidemic behavior of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001; 22(5):284-8.

Koh, TH; Sng, LH; Wang, GC; Hsu, LY; Zhao, Y. IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Apr;59(4):627-32.

Kollef, MH; Fraser, VJ. Antibiotic resistance in the intensive care unit. *Ann Intern Med.* 2001; 134:298-314.

Konemam, EW; Allen, SD; Janda, WM; Schreckenberger, PC, Jr. WCW. Enterobacteriaceae. In: Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5 ed. Editora Médica e Científica Ltda - MDSI, Rio de Janeiro, RJ, 2001:177-261.

Landman, D; Quale, J; Mayorga, D; Adedeji, A; Vangala, K; Ravishankar, J; Flores, C; Brooks, S. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, N.Y.: the preantibiotic era has returned. *Arch Intern Med.* 2002; 162:1515–1520.

Landman, D; Bratu, S; Kochar, M; Panwar, M; Trehan, M; Quale J. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, N.Y. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60:78–82.

- Lee, S *et al.* Risk Factors for Acquisition of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*; a Case-Control Study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(1):224-28.
- Lee, K; Yum, JH; Yong, D; Lee, HM; Kim, HD; Docquier, J; Rossolini, GM; Chong, Y. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *blaSIM-1*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49:4485-91.
- Levin, AS; Levy, CE; Manrique, AE; Medeiros, EA; Costa, SF. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicilin/sulbactam. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2003; 21 (1) 58-62.
- Limansky, AS; Mussi, MA; Viale, AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40: 4776-78.
- Lincopan, N; Mcculloch, JA; Reinert, C; Cassettari, VC; Gales, AC; Mamizuka, EM. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient of Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005; 43 (1): 516-19.
- Lincopan, N; Leis, R; Vianello, MA; Araújo, MR; Ruiz, AS; Mamizuka, EM. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. *Journal of Medical Microbiology*, 2006;
- Livermore, DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect. Dis.* 1991; Suppl 78, 7-16.
- Livermore, DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8:557-84.
- Livermore, DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002; 34(5):634-40.
- Livermore, DM. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 Suppl 1:3-10.

Lu, PL; Doumith, M; Livermore, DM; Chen, TL; Woodford, N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(4):641-7.

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

Marais, EG; de Jong, V; Ferraz, B; A. G. Duse. Interhospital transfer of pan-resistant *Acinetobacter* strains in Johannesburg, South Africa. *Am J Infect Control.* 2004; 32:278–281.

Marcham, D; Navon-Venezia, S; Schwartz, D; Tarabeia, J; Fefer, I; Schwaber, MJ; Carmeli, Y. Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(5):1551-5.

Marque, S; Poirel, L; Heritier, C; Brisse, S; Blasco, MD; Filip, R; Coman, G; Naas, T; Nordmann, P. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4885–8.

Martinez-Martinez, L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 Suppl 1:82-9.

Mendes, C; Oplustil, C; Sakagami, E; Turner, P; Kiffer, C. Mystic Brazil Group. Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC program Brazil 2002. *Brazilian Journal Infetion Diseases*, 2005, 9: 44-51.

Michalopoulos, A; Falagas, ME. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Expert Opin Pharmacother*, 2010; 11 (5): 779-88.

Mostachio, AK; van der Heidjen, IM; Rossi, F; Levin, AS; Costa, SF. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding Oxa and metallo-beta-lactamases in carbapenem resistant *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol.* 2009; 58(pt.11):1522-4.

Moubareck, C; Brémont, S; Conroy, MC; Courvalin, P; Lambert, T. GES-11, a novel integron-associated GES variante in *Acinetobacter baumannii*. *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(8):3579-81.

Mugnier, PD; Poirel, L; Naas, T; Nordmann, P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jan;16(1):35-40.

Munoz-Price, LS; Weinstein, RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med*. 2008 Mar 20;358(12):1271-81.

Murphy, TA; Simm, AM; Toleman, MA; Jones, RN; Walsh, TR. Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003; 47:582-7.

Naas, T; Nordmann, P. OXA-Type beta-lactamases. *Curr Pharm Des*. 1999; 5(11):865-79.

Naas, T; Levy, M; Hirschauer, C; Marchandin, H; Nordmann P. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4826-9.

Nemec, A; Musilek, M; Maixnerova, M; Baere, T; van der Reijden, TJK; Vaneechoutte, M; Dijkshoorn, L. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst and Evolut Microbiol*. 2009; 59:118–24

Nikaido, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1989; 33:1831-6.

Nikaido, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem* 1994; 269:3905-8.

Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67(4):593-656.

Niumsup, PR; Boonkerd, N; Tansawai, U; Tiloklurs, M. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. *Jpn J Infect Dis*. 2009 Mar;62(2):152-4.

Nordmann, P; Poirel, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8(6):321-31.

Obara, M; Nakae, T. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28:791-800.

Pagel, JE; Seyfried, PL. Numerical taxonomy of aquatic *Acinetobacter* isolates. *J Gen Microbiol*. 1976; 95:220-32.

Parr, TR; Moore, RA; Moore, LV; Hancock, RE. Role of porins in intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1987; 31:121-3.

Peleg, AY; Bell, JM; Hofmeyr, A; Wiese, P. Inter-country transfer of gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58 carbapenem-hydrolyzing enzymes. *J Antimicrob Chemother*. 2006a; 57:794-5.

Peleg, AY; Franklin, C; Walters, LJ; Bell, JM; Spelman, DW. OXA-58 and IMP-4 carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture isolate from Australia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006b Jan;50(1):399-400.

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

Pfaller, MA; Hollis, RJ; Sader, HS. Molecular Biology - PFGE Analysis of chromosomal restriction fragments. In: Isenberg HD - Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, ASM Press, 1992, p.10.5.c.1-10.5.c.11,.

Philippon, A; Arlet, G; Jacoby, GA. Plasmid-Determined AmpC-Type beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(1):1-11.

Pittet, D; Li, N; Wenzel, RP. Association of secondary and polymicrobial nosocomial bloodstream infections with higher mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993; 12:813-19.

Pittet, D; Tarara, D; Wenzel, RP. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA*. 1994; 271:1598-601.

Poirel, L; Naas, T; Nicolas, D; Collet, L; Bellais, S; Cavallo, JD; Nordmann, P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid-and-integron-borne gene



from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in France. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2000; 44(4):891-7.

Poirel, L; Magalhaes, M; Lopes, M; Nordmann, P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamases gene *bla<sub>SPM-1</sub>* surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2004, 48 (4): 1406-1409.

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.*,2005; 49:202–8.

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

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

Poirel, L; Naas, T; Nordmann, P. Diversity, Epidemiology and Genetics of class D β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1):24-38.

Poole, K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002; 3(2):77-98.

Prashanth, K; Badrinath, S. Nosocomial infections due to *Acinetobacter* species: Clinical findings, risk and prognostic factors. *Indian J Med Microbiol.* 2006; 24(1):39-44.

Quale, J; Bratu, S; Landman, D; Heddurshetti, R. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin Infect Dis.* 2003; 37:214–220.

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

Recchia, N; Hall, RM. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol.* 1997; 5(10):389-94.

Rossau, R; Landschoot, AV; 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.* 1991; 41:310-19.

Rossolini, GM; D'Andrea, MM; Mugnaioli, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008; 14 Suppl 1:33-41.

Russo, TA; MacDonald, U; Beanan, JM; Olson, R; MacDonald, IJ; Sauberan, SL; Luke, NR; Schultz, LW; Umland, TC. Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. *J Infect Dis.* 2009; 199(4):513-21.

Sacha, P; Wieczorec, P; Hauschild, T; Zórawski, M; Olszanska, D; Trynieszewska, E. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*: a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochemica et Cytobiologia*, 2008; 46 (2): 137- 42.

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

Sanders, CC; Bradford PA; Ehrhardt, AF; Bush, K; Young, KD; Henderson, TA; Sanders, WE Jr. Penicillin-binding proteins and induction of AmpC beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(9):2013-5.

Scaife, W; Young, HK; Paton, RH; Amyes, SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J Antimicrob Chemother.* 1995; 36:585-6.

Schimith Bier, KE; Luiz, SO; Scheffer, MC; Gales, AC; Paganini, MC; Nascimento, AJ; Carignano, E; Dalla Costa, LM. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil, 2010; *American Journal of Infection Control*, 2010; 31.

Simhon, A *et al.* *Acinetobacter baumannii* at a Tertiary-Care Teaching Hospital in Jerusalem, Israel. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(1):389-91.

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

Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973) Numerical taxonomy. pp. 573.

Spratt, BG; Cromie, KD. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis*. 1998; 10(4):699-711.

Su, XZ; Chen, J; Mizushima, T *et al.* AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:4362-4.

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

Tenover, FC; Arbeit, RD; Goering, RV; Mickelsen, PA; Murray, BE; Persing, DH; Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol*. 1995; 33:2233-2239.

Tognim, MCB; Andrade, SS; Silbert, S; Gales, AC; Jones, RN; Sader, HS. Resistance Trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and Characterization of International Dissemination of Multi-Drug Resistant Strains: 5-Year Report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Infect Dis*. 2004; 8(5):284-91.

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

Toleman, MA; Simm, AM; Murphy, TA; Gales, AC; Biedenbach, DJ; Jones, RN; Walsh, TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 50:673-9.

Tomaras, AP; Dorsey, CW; Edelman, RE; Actis, LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*. 2003; 149:3473–84.

Tumbarello, M; Spanu, T; Sanguinetti, M; Citton, R; Montuori, E; Leone, F; Fadda, G; Cauda, R. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006; 50:498-504.

Turton, JF; Ward, ME; Woodford, N; Kaufmann, ME; Pike, R; Livermore, DM; Pitt, TL. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett*. 2006; 258:72-7.

Unal, S; Garcia-Rodriguez, J. A. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Isolated in the MYSTIC Program, 2002–2004. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005; 53:265–271.

Vahaboglu, H; Ozturk, R; Aygun, G; Coskuncan, F; Yaman, A; Kaygusuz, A *et al*. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41:2265-9.

Vanechoutte, M; Nemeč, A; Musilek, M; van der Reijden, TJK; van den Barselaar, M; Tjernberg, I; Calame, W; Fani, R; de Baere, T; Dijkshoorn, L. Description of *Acinetobacter venetianus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009; 59:1376-81.

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

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

Villegas, MV; Kattan, JN; Quinteiros, MG; Casellas, JM. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14:154- 8.

Walsh, TR; Hall, L; Assinder, SJ; Nichols, WW; Cartwright, SJ; MacGowan, AP; Bennett, PM. Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1994; 1218:199-201.

Walsh, TR; Toleman, MA; Hryniewicz, W; Bennett, PM; Jones, RN. Evolution of an integron carrying *bla*VIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(1):116-9.

Walther-Rasmussen, J; Høiby, N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57(3):373-83.

Warren, DK; Zack, JE; Elward, AM; Cox, MJ; Fraser, VJ. Nosocomial primary bloodstream infections in intensive care unit patients in a nonteaching community medical center: a 21-month prospective study. *Clin. Infect. Dis*. 2001; 33:1329-35.

Watanabe, M; Iyobe, S; Inoue, M; Mitsushashi, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991; 35(1):147-51.

Webber, MA; Piddock, LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Jan;51(1):9-11.

Weist, K *et al*. How many nosocomial infections are associated with cross-transmission? A prospective cohort study in a surgical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002; 23(3):127-32.

Winokur, PL; Canton, R; Casellas, JM; Legakis, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin. Infect. Dis*. 2001; 32 Suppl 2:S94-103.

Wisplinghoff, H; Bischoff, T; Tallent, SM; Seifert, H; Wenzel, RP; Edmond, MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis*. 2004; 39:309-17.

Woodford, N; Ellington, MJ; Coelho, JM; Turton, JF; Brown, S; Amyes, SGB; Livermore, DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *neg*a, 2006; 27 (4): 351-353.

Yamazaki, E; Ishii, J; Sato, K; Nakae, T. The barrier function of the outer membrane of *Pseudomonas maltophilia* in the diffusion of saccharides and beta-lactam antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* 1989; 51:85-8.

Yang, HY; Lee, HJ; Suh, JT; Lee, KM. Outbreaks of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 beta-lactamase in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Med J.* 2009 Dec 31;50(6):764-70.

Yong, D; Shin, JH; Kim, S; Lim, Y; Yum, JH; Lee K *et al.* High prevalence of PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1749-51.

Zakuan, ZD; Azian, H; Mahamarowi, O; Md Radzi, J. The prevalence and risk factors of nosocomial *Acinetobacter* blood stream infections in tertiary teaching hospital in north-eastern Malaysia. *Trop Biomed.* 2009 Aug;26(2):123-9.

Zarrilli, R *et al.* Molecular Epidemiology of Sequential Outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit Shows the Emergence of Carbapenem Resistance. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(3):946-53.

Zhou, H; Yang, Q; Yu, YS; Wei, ZQ; Li, LJ. Clonal spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* among different cities of China. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(12):4054-7.

## 8. RESUMO

**Objetivo geral:** Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos e ampicilina/sulbactam, e produção de carbapenemases entre isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. provenientes de infecção de corrente sanguínea de pacientes hospitalizados nos centros médicos do Programa de Vigilância SCOPE Brasil, entre junho de 2007 e julho de 2009; **Objetivos específicos:** (i) avaliar perfil de sensibilidade aos antimicrobianos imipenem, meropenem e ampicilina/sulbactam pelo método de diluição em ágar; (ii) caracterizar a frequência e tipos de metalo- $\beta$ -lactamases presentes nos isolados resistentes aos carbapenêmicos; (iii) Determinar a frequência dos genes codificadores de oxacilinases entre os isolados resistentes aos carbapenêmicos. **Material e Métodos:** Foram avaliadas 206 isolados de *Acinetobacter* spp. isoladas do primeiro episódio de infecção de corrente sanguínea (ICS) de pacientes hospitalizados em 16 centros médicos de diferentes regiões do país, participantes do isolados foram submetidos a diluição em ágar para imipenem, meropenem e ampicilina/sulbactam para obter a CIM desses antimicrobianos. Os isolados resistentes a imipenem e/ou meropenem foram submetidos à PCR multiplex em tempo real para detecção dos genes codificadores de M $\beta$ L (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>) e PCR multiplex para detecção de genes codificadores de oxacilinases (*bla*<sub>OXA23-like</sub>, *bla*<sub>OXA24-like</sub>, *bla*<sub>OXA51-like</sub>, *bla*<sub>OXA58-like</sub>). Os isolados carreadores de *bla*<sub>IMP</sub> foram submetidos ao PFGE. **Resultados e Conclusões:** As taxas de resistência foram 63% para imipenem (CIM<sub>50</sub> 64  $\mu$ g/mL e CIM<sub>90</sub> 256  $\mu$ g/mL) e meropenem (CIM<sub>50</sub> 32  $\mu$ g/mL e CIM<sub>90</sub> 256  $\mu$ g/mL) e 45% para ampicilina/sulbactam (CIM<sub>50</sub> 8  $\mu$ g/mL e CIM<sub>90</sub> 64  $\mu$ g/mL). Dos 130 isolados submetidos a pesquisa M $\beta$ L 24 (18%) apresentaram o gene *bla*<sub>IMP</sub> e para pesquisa de OXA 94 (74%) apresentaram o gene *bla*<sub>OXA23-like</sub> e 24(20%) somente o gene *bla*<sub>OXA51-like</sub>. As altas taxas de resistência aos carbapenêmicos variaram em relação a região geográfica brasileira. A detecção do gene *bla*<sub>IMP</sub> em apenas 24% dos isolados demonstra não ser este o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos nesse estudo. Entretanto foi observada disseminação do gene *bla*<sub>OXA23-like</sub> em todas as regiões brasileiras, caracterizando o principal mecanismo de resistência frente aos carbapenêmicos. Foi observada disseminação clonal em um hospital em Fortaleza e entre 3 hospitais em São Paulo nos isolados carreadores do gene *bla*<sub>IMP</sub>.

## 9. ABSTRACT

**Main Objective:** To evaluate the susceptibility profile to antibiotics carbapenems and ampicillin/sulbactam, and the carbapenemases production among bloodstream isolates of *Acinetobacter* spp. from hospitalized patients participating in the SCOPE Program, period of June 2007 to July 2009. **Specific objectives:** (i) to evaluate the susceptibility to imipenem, meropenem and ampicillin/sulbactam by agar dilution; (ii) to characterize the frequency and types of metallo- $\beta$ -lactamases in the carbapenem resistant isolates; (iii) to determine the frequency of oxacillinases coding genes among the carbapenem resistant isolates. **Material and Methods:** 206 isolates from the first blood stream nosocomial infection from 16 medical centers from the 5 regions of the country were susceptibility tested by agar dilution for imipenem, meropenem and ampicillin/sulbactam. The carbapenem resistant isolates were submitted to Real time multiplex PCR for detection of MBL genes (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>) and oxacillinases coding genes (*bla*<sub>OXA23</sub>-like, *bla*<sub>OXA24</sub>-like, *bla*<sub>OXA51</sub>-like, *bla*<sub>OXA58</sub>-like). The isolates carrying *bla*<sub>IMP</sub> were typed by PFGE. **Results and Conclusion:** 63% of the isolates were resistant to carbapenems (imipenem CIM<sub>50</sub> 64  $\mu$ g/mL e CIM<sub>90</sub> 256  $\mu$ g/mL); meropenem (CIM<sub>50</sub> 32  $\mu$ g/mL e CIM<sub>90</sub> 256  $\mu$ g/mL) and 45% to ampicillin/sulbactam (CIM<sub>50</sub> 8  $\mu$ g/mL e CIM<sub>90</sub> 64  $\mu$ g/mL). 24 (18%) carbapenem resistant isolates showed *bla*<sub>IMP</sub>. 94 (74%) showed *bla*<sub>OXA23</sub> and 26 (20%) showed only *bla*<sub>OXA51</sub>. The highest resistant rate to carbapenem was observed in the Northeast region and the lowest rate in the South region. Clonal hospital and inter-hospital dissemination was observed for IMP carrying isolates but not among the different regions.



**ANEXO 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa ao Projeto SCOPE Brasil**

Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 9 de março de 2007  
**CEP 0222/07**

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) ANTONIO CARLOS CAMPOS PIGNATARI

Co-Investigadores: Alexandre Rodrigues Marra; Ana Cristina Gales; Carlos Alberto Pires Pereira

Disciplina/Departamento: Infectologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL**

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Projeto Brazilian SCOPE (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance)”**.

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** estudo com colaboração de centros brasileiros com envio de isolado microbiológico.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** não se aplica.

**OBJETIVOS:** Avaliar as características epidemiológicas das ICS (infecções de corrente sanguínea) hospitalares no Brasil, a distribuição das espécies e o perfil de resistências dos patógenos causadores de infecção..

**RESUMO:** Os dados clínicos serão colhidos de forma prospectiva pelos controlados de infecção dos centros brasileiros selecionados que submeterão as informações para o centro coordenador -Unifesp com envio de cada isolado microbiológico. Os critérios de inclusão serão os seguintes: 1) as ICS hospitalares serão definidas pelo isolamento de uma ou mais amostras de hemoculturas positivas em pelo menos 48 horas de admissão com organismo patogênico; 2) Episódios repetitivos de ICS num mesmo paciente serão excluídos, porém novos episódios de ICS que ocorram num mesmo paciente em diferentes admissões serão considerados como casos separados; 3) os hospitais brasileiros que participarem do estudo deverão participar por pelo menos 12 meses e os hospitais que não participarem do tempo mínimo estipulado estarão excluídos do estudo. As taxas de incidência das ICS deverão ser calculadas pelo número de ICS por 10 000 admissões hospitalares. Para o cálculo das taxas de incidência, deverão ser coletados dados sobre as admissões hospitalares de cada hospital. A identificação dos isolados de hemoculturas bem como os testes de sensibilidade deverão ser realizados pelos laboratórios afiliados aos centros hospitalares brasileiros incluídos. Todos os laboratórios deverão constar de certificação e utilizar metodologia microbiológica com critérios adotados pelo CLSI. Os resultados serão analisados para as variáveis contínuas, os valores das médias serão comparados usando o teste t para as amostras independentes. Diferença nas proporções serão comparadas usando o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando apropriado. Os valores das médias serão descritos com os seus respectivos desvios-padrão teste de Mann Whitney será realizado para testar a igualdade das variáveis contínuas..

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** A meta será alcançar ao redor de 15000 de corrente sanguíneas de relevância clínica abrangendo as cinco regiões brasileiras (Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste).

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil  
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

**MATERIAL E MÉTODO:** descritos os procedimentos que serão realizados.

**TCLE:** não se aplica.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** FAPESP R\$ 178 746,00.

**CRONOGRAMA:** 24 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** sem objetivo acadêmico.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 8/3/2008 e 8/3/2009.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

**Recomendação:** O CEP aguarda carta de aprovação FAPESP e comunicado dos centros que participarão da pesquisa apresentando carta de concordância

**ANEXO 2:** Ficha elaborada para a coleta de dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes e dados microbiológicos das amostras avaliadas no Projeto SCOPE Brasil.

Número do Hospital \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ Sexo:  M  F NºProntuario \_\_\_\_\_ RGLab \_\_\_\_\_

Data da admissão: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data da 1ª hemocultura positiva \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Condições na alta:  Alta  Óbito

Diagnóstico primário: <input type="checkbox"/> Neoplasia/Leucemia/linfoma <input type="checkbox"/> Cardíaco <input type="checkbox"/> Renal <input type="checkbox"/> Hepático <input type="checkbox"/> Neurológico <input type="checkbox"/> Diabetes mellitus <input type="checkbox"/> Transplante <input type="checkbox"/> sólido <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> Pulmonar <input type="checkbox"/> Vascular <input type="checkbox"/> Gastrointestinal <input type="checkbox"/> Trauma <input type="checkbox"/> Outro Nome do órgão _____	Unidade de internação <input type="checkbox"/> Cirurgia geral <input type="checkbox"/> Cirurgia cardíaco-torácica <input type="checkbox"/> Clínica Médica <input type="checkbox"/> Hematologia adulto/oncologia <input type="checkbox"/> Neurocirurgia <input type="checkbox"/> Obstetrícia <input type="checkbox"/> Ginecologia <input type="checkbox"/> Oftalmo/Otorrino/Cab.pescoco <input type="checkbox"/> Ortopedia <input type="checkbox"/> Pediatria <input type="checkbox"/> Ped. Hematologia/oncologia <input type="checkbox"/> Psiquiatria <input type="checkbox"/> Urologia <input type="checkbox"/> Outro	Fatores risco (com 48hrs): <input type="checkbox"/> Cateter periférico <input type="checkbox"/> Cateter venoso central <input type="checkbox"/> NPP <input type="checkbox"/> Acesso arterial <input type="checkbox"/> PIC (neuro) <input type="checkbox"/> Cateter vesical <input type="checkbox"/> Hemodiálise <input type="checkbox"/> Diálise peritoneal <input type="checkbox"/> Ventilação mecânica <input type="checkbox"/> N° neutrófilos < 1,000 <input type="checkbox"/> Outro (liste) _____	Fonte da bacteremia: <input type="checkbox"/> Desconhecida <input type="checkbox"/> Queimadura <input type="checkbox"/> Ouvido, nariz, garganta <input type="checkbox"/> Gastrointestinal <input type="checkbox"/> Ginecológico <input type="checkbox"/> Primária (acesso central) <input type="checkbox"/> Trato resp. inferior <input type="checkbox"/> Pele <input type="checkbox"/> Trato urinário <input type="checkbox"/> Ferida cirúrgica <input type="checkbox"/> Ferida, outra <input type="checkbox"/> Outro (liste) _____
---	---	--	--

UTI  S  N

**DADOS MICROBIOLÓGICOS**

Identificação do organismo\*

- 1- \_\_\_\_\_  
 2- \_\_\_\_\_  
 3- \_\_\_\_\_

## Resultados do antibiograma \*

Antimicrobianos	Antimicrobianos	Org. # 1	Org. # 2	Org # 3
Penicilinas	Ampicilina			
	Oxacilina			
	Penicilina			
β-lactam/inibidores de β-Lactamase	Ampicilina/Sulbactam			
	Piperacilina/Tazobactam			
	Ticarcilina/Clavulanato			
Cefalosporinas	Cefalotina/ Cefazolina			
	Cefuroxime			
	Cefoxitina			
	Cefotetan			
	Cefotaxime			
	Ceftriaxone			
	Cefoperazone			
Outros β - lactams	Ceftazidime			
	Cefepime			
	Aztreonam			
	Imipinem			
Aminoglicosídeos	meropenem			
	Ertapenem			
	Amicacina			
	Gentamicina			
Fluoroquinolonas	Tobramicina			
	Ciprofloxacina			
	Ofloxacina			
	Moxifloxacina			
Drogas com espectro para Gram (+)	Levofloxacina			
	Clindamicina			
	Eritromicina			
	Teicoplanina			
	Vancomicina			
	Quinupristin/Dalfopristin			
Outras drogas	Linezolid			
	Daptomicina			
	Rifampicina			
	Trim./Sulfa			

\* O nome dos isolados clínicos e o perfil de sensibilidade deve ser preenchido antes do transporte da cepa. A sensibilidade antimicrobiana deve ser listada pela categoria (S, I, R) de acordo com o CLSI.

# 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](#)