JÉSSICA SANCHEZ DE FREITAS WERNECK

Estudo da Similaridade Genética de Amostras de *Acinetobacter baumannii* Produtoras de Carbapenemases do Tipo OXA Isoladas em Diversos Hospitais Brasileiros

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

JÉSSICA SANCHEZ DE FREITAS WERNECK

Estudo da Similaridade Genética de Amostras de *Acinetobacter baumannii* Produtoras de Carbapenemases do Tipo OXA Isoladas em Diversos Hospitais Brasileiros

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Ana Cristina Gales

Co-orientadora: Dr[a]. Renata Cristina Picão

São Paulo

2010

Werneck, Jéssica Sanchez
Estudo da similaridade Genética de Amostras de *Acinetobacter baumannii* Produtoras de Carbapenemases do Tipo OXA isoladas em Diversos Hospitais Brasileiros. Jéssica Sanchez de Freitas Werneck -- São Paulo/SP – Brasil, 2010.

108 f. XVI.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação Ciências Básicas em Infectologia

Título em Inglês: Genetic relationship among OXA-carbapenemase producing *Acinetobacter baumannii* isolated from distinct Brazilian hospitals

1. β-lactamase, 2. *Acinetobacter baumannii*, 3. OXA-23, 4. OXA-72

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

JÉSSICA SANCHEZ DE FREITAS WERNECK

Estudo da Similaridade Genética de Amostras de *Acinetobacter baumannii* Produtoras de Carbapenemases do Tipo OXA Isoladas em Diversos Hospitais Brasileiros

Presidente da banca:

Profª. Drª. Ana Cristina Gales

Banca examinadora:

Titular: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Titular: Profª. Drª. Anna Sara Shafferman Levin

Titular: Profª. Drª. Luci Corrêa

Suplente: Profª. Drª. Rosa Maria Silva

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me apoiaram para a conclusão do mesmo.

Em especial, Marcio Werneck (marido), Leila Sanchez (mãe), Wilma (avó), Priscila (irmã) e Famílias Sanchez/Werneck pelo apoio e compreensão da minha ausência neste período.

Agradeço primeiramente a Deus, Jesus e meus irmãos pelo apoio, força e conselhos nos momentos mais difíceis da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço por todos esses anos que me envolvi com pesquisa...

... a minha orientadora, **Profa. Dra. Ana Cristina Gales** pela oportunidade, confiança e carinho. Pelos ensinamentos e engrandecimentos, tanto pessoal quanto profissional, obtidos durante esses últimos 2 anos e meio.

... a minha co-orientadora, **Dra. Renata Cristina Picão** pela amizade, conselhos e por compartilhar seus conhecimentos.

... ao meu "orientador", **Prof. Dr. Antônio Carlos Pignatari**, pelos conselhos, oportunidade e orientações.

...ao **CNPQ, FAPESP, CIEE e FUNDAPE** pelas bolsas proporcionadas ao longo desses anos.

...a minha amiga **Dra. Cecília G. Carvalhaes** pela ajuda, apoio e alegria, que me era transmitida todos os dias em que estava presente.

... a todos os **alunos** do laboratório **ALERTA** por fazer parte da minha vida e me ajudar em TUDO, não esquecerei jamais.

... a todos os **alunos** do laboratório **LEMC** por me receberem tão bem no meu probatório e passar tanta experiência e carinho.

... a **Rosana Capecce** (secretária LEMC) pela confiança e ajuda.

... a **Eliete A. Frigatto**, **Dra Toninha** e **funcionários do Laboratório Central/Hospital São Paulo** pela ajuda e materiais doados para realização desta dissertação.

... ao **Marquinhos** do 13º andar pelos empréstimos de equipamentos.

... a **Dra. Soraya Andrade** (LEMC/AFIP) pela confiança e oportunidade de realizar este mestrado.

... ao **Dr. Sergio Tufik** (AFIP) pela oportunidade de desenvolver pesquisa na AFIP e incentivo a realização deste mestrado.

... ao **Dr. Alexandre Gabriel Jr.** (*in memorian* - AFIP*)* por me supreender no Congresso AACC.

... a amiga **Telma Carniato** (AFIP) pela amizada, confiança e oportunidade.

... ao grande biólogo **Paulo** e a veterinária **Dra. Renata,** do antigo CEMAS, por toda a experiência e oportunidade de aprendizado com animais silvestres.

... a **Célia** e **Dorival Salgado** (Salgado Contabilidade) por estender a mão quando mais precisei.

... ao **Prof. Dr. Alexandre Pires Aguiar,** Museu de zoologia da USP, pela rigorosa orientação na minha iniciação científica.

... ao **Prof. Dr. Flavio de Barros Molina,** ex-chefe do setor de répteis do Zoológico de São Paulo, pela confiança, experiência e por ser meu primeiro orientador, que através do seu fascícinio e dedicação à pesquisa, me mostrou o quanto essa área era interessante.

... ao **Prof. Dr. Armando Luís Serra,** da Universidade de Guarulho, pelo carinho, por me ensinar zoologia e por ser o responsável por todos esses anos de pesquisa.

Agradeço também...

... ao meu marido, **Marcio Werneck** por me acompanhar, apoiar e me incentivar em TODAS as minhas decisões ao longo desses 12 anos juntos.

... a minha amada mãe, **Leila Sanchez** por todo o sacrifício realizado para que eu pudesse ser o que sou. Serei eternamente grata.

... a família Sanchez, **Priscila**, **Ricardo**, **Wilma**, **Jeferson**, **Julia, Juliana, Jaqueline** e o mais novo membro **Pedro** (avô) por compreender a minha ausência e me apoiarem em meus estudos e crescimento profissional.

... a família Werneck, **Celina**, **Dauster**, **Márjorie** e **Caio** por compreender a minha ausência e me apoiarem em meus estudos e crescimento profissional.

... aos amigos **Michele G. G. Mattos** e **Theodomiro Nestor de Mattos** pela amizade, apoio e por sempre se lembrarem de mim.

... aos meus amigos/vizinhos **Mônica, Michel, Luany, Saulo** pela amizade, companhia e apoio para realização deste mestrado, e **Heitor** que chegou trazendo alegria, que nos contagia, mudando nossas vidas.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 1

OBJETIVOS 6

REVISÃO DA LITERATURA 7

1. Patógeno 7

2. β-lactamases 9

3. β-lactamases em *Acinetobacter* spp. 13

3.1 Cefalosporinases cromossomais (Grupo 1 - Bush/Jacoby 2010) 13

3.2 β-lactamases de espectro limitado (Gupo 2; subgrupo 2b – Bush/Jacoby 2010) 14

3.3 β-lactamases de amplo espectro - ESBL (Gupo 2; subgrupo 2be – Bush/Jacoby 2010) 15

3.4 Carbenicilinase (Gupo 2; subgrupo 2c e 2ce – Bush/Jacoby 2010) 17

3.5 Oxacilinases (Gupo 2; subgrupo 2d , 2de, 2df – Bush/Jacoby 2010) 19

3.5.1 Oxacilinases de espectro limitado (Gupo 2; subgrupo 2d – Bush/Jacoby 2010) 20

3.5.2 Carbapenemases do tipo OXA (Gupo 2; subgrupo 2df – Bush/Jacoby 2010) 21

3.5.2.1 Subgrupo OXA-23-like 22

3.5.2.2 Subgrupo OXA-24/40-like 23

3.5.2.3 Subgrupo OXA-51-like 24

3.5.2.4 Subgrupo OXA-58-like 25

3.5.2.5 Subgrupo OXA-143 25

3.6 Carbapenemases (Gupo 2; subgrupo 3f – Bush/Jacoby 2010) 29

3.7 Metalo-β-lactamases (MBLs, Grupo 3 - subgrupo 3a – Bush/Jacoby 2010) 30

4. Outros mecanismos 35

4.1 Impermeabilidade da membrana externa – OMPs 35

4.2 Hiperexpressão da bomba de efluxo 39

5.Epidemiologia das carbapenemases do tipo OXA em *Acinetobacter* spp. 44

5.1Epidemiologia na América Latina 46

ARTIGO I 49

ARTIGO II 65

DISCUSSÃO 73

CONCLUSÕES 81

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83

ANEXOS 100

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Esquema de classificação das β-lactamases adaptada da tabela original de Bush & Jacoby, 2010 12

Tabela 2. β-lactamases identificadas em *Acinetobacter* spp. (adaptado de Zavascki *et al*., 2010) 34

Tabela 3. Proteínas de membrana externa presentes em *Acinetobacter* spp. (adaptado de Zavascki *et al*., 2010) 38

Tabela 4. Sistemas de effluxo em isolados de *Acinetobacter* spp. (adaptado de Zavascki *et al*., 2010) 43

ARTIGO I

Tabela 1. Characteristics and clusters of OXA-23-producing *A. baumannii* isolates collected from 17 Brazilian medical centers 63

ARTIGO II

Tabela 1. Antimicrobial susceptibility profile of *A. baumannii* A30235 clinical isolate, the recipient strain *A. baumannii* ATCC 19606, and the transconjugant *A. baumannii* ATCC 19606 carrying bla_{OXA-72}. 72

ANEXOS

Tabela Anexo III. Perfil de sensibilidade das 91 amostras de *A. baumannii* isoladas de 17 hospitais brasileiros 102

Tabela Anexo IV. MIC_{50} e MIC_{90} de antimicrobianos contra os isolados *A. baumannii* produtores de OXA-23/OXA-51 estudados. 106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição e contexto genético das oxacilinases em *A. baumannii.* 27

Figura 2: Árvore filogenética dos quatro subgrupos de carbapenemase do tipo OXA (2009) 28

ARTIGO I

Figura 1. Dendrogram analysis of 76 OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates (A) and geographic distribution of the three main clusters of OXA-23-producing isolates (B) 64

ANEXOS

Figura Anexo I. Carta comprobatória do envio do artigo I ao periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 100

Figura Anexo II. Carta comprobatória do envio do artigo II ao periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 101

Figura Anexo V. Árvore filogenética resultante da tipagem, por PFGE, dos 76 isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23 estudados..... 107

Figura Anexo VI. (A) Gel de eletroforese de extração de DNA plasmidial. (B) Hibridização do DNA presente no gel de eletroforese com sonda marcada específica para o gene $bla_{OXA-72.}$ 108

RESUMO

Nesta dissertação são apresentados dois estudos envolvendo isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* que apresentaram mecanismos enzimáticos de resistência aos carbapenêmicos, a produção de carbapenemases do tipo OXA.

O primeiro estudo avalia a relação genética de amostras de *A. baumannii* multirresistentes produtoras de OXA-23 provenientes de distintas cidades brasileiras. 91 amostras clínicas de *A. baumannii* foram isoladas em 17 centros médicos localizados nas cidades de São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Porto Alegre (RS), Blumenau (SC), Curitiba (PR), São Luiz (MA) e Salvador (BA). Nesta coleção observamos altas taxas de resistência aos carbapenêmicos (91.2%) e presença do gene $bla_{\text{OXA-23-like}}$ em 83,5% dos isolados. O elemento de inserção IS*Aba1* à montante ao gene $bla_{\text{OXA-23}}$ foi detectado em todos os 76 isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23. Nove grupos de genótipos foram observados entre os 76 isolados produtores de OXA-23. Nossos achados sugerem que o gene $bla_{\text{OXA-23}}$ presente nestes isolados estava localizado DNA cromossomal. Três principais grupos (A, B e D) foram observados circulando em seis cidades das regiões sudeste e sul do Brasil, sendo que o genótipo predominante (A) apresentou relação clonal àquele primeiramente descrito na cidade de Curitiba, em 2003. Em contrapartida foi encontrado um único genótipo de *A. baumannii* produtor de OXA-23 na cidade de São Luís. Embora existam estudos brasileiros prévios reportando a disseminação de clones de *A. baumannii* pordutores de OXA-23 localmente, nenhum estudo brasileiro demonstrou antes, i) a análise comparativa dos genótipos originários de diferentes e distantes cidades brasileiras, ii) a provável localização do gene $bla_{\text{OXA-23}}$ e iii) a presença do elemento IS*Aba1* à montante ao gene $bla_{\text{OXA-23}}$,o que pode ter levado ao alto grau de resistência aos carbapenens observado. Desta maneira, o estudo demonstra a circulação de clones de *A. baumannii* produtores de OXA-23 no Brasil e enfatiza que medidas de controle de infecção são urgentemente necessárias para reduzir tanto a disseminação de isolados multirresistenes quanto o número de infecções causadas por este patógeno.

O segundo estudo trata de um relato de caso de um paciente internado em um hospital da cidade de São Paulo, que apresentou uma infecção por *A. baumannii* produtor de OXA-72. O isolado em questão, A 30235, apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados, com excessão à ampicilina/sulbactam tendo apresentado redução da sensibilidade a esta associação. Foi realizada com sucesso a transformação do plasmídeo presente no isolado A30235 na cepa de *A. baumannii* ATCC 19606. A confirmação da presença do gene $bla_{\text{OXA-72}}$ no transformante evidenciou a localização plasmidial deste determinante de resistência. O plasmídio contendo o gene $bla_{\text{OXA-72}}$ apresentou um peso molecular de aproximadamente 86 Kb. Neste estudo identificamos pela primeira vez no Brasil, um isolado clínico de *A. baumannii* produtor de OXA-72. A presença deste determinante de resistência codificado por um gene localizado em um elemento genético móvel demonstra a crescente diversidade de carbapenemase do tipo OXA no Brasil com potencial de disseminação. Medidas de controles adequadas deverão ser tomadas para evitar a disseminação de isolados produtores de OXA-72 entre os hospitais brasileiros, o que tem ocorrido com os isolados de *A. baumannii* produtor de OXA-23.

ABSTRACT

In this dissertation we present two studies involving carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates due to the production of carbapenems modifying enzymes, the OXA-type carbapenemases.

The first study aimed to determine the genetic relationship of multi-drug-resistant *A. baumannii* producing OXA-23 that was isolated in distinct Brazilian cities. A total of 91 *A. baumannii* clinical isolates were recovered from 17 medical centers located at eight cities, namely São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Porto Alegre (RS), Blumenau (SC), Curitiba (PR), São Luiz (MA) and Salvador (BA). In this collection we observed high rates of carbapenems resistance (91.2%). Also, the $bla_{\text{OXA-23-like}}$ gene was present in 83.5% of isolates. The insertion sequence IS*Aba1* was positioned upstream the $bla_{\text{OXA-23}}$ gene in all OXA-23-producing *A. baumannii* identified. Nine clusters were observed among OXA-23 producers. Our fidings suggest that the $bla_{\text{OXA-23}}$ gene was probably chromosomally-located in all isolates studied. Three clusters (A, B and D) were found in six cities from southeast and southern reagions of Brazil. In addition, the predominant cluster (A) was clonally related to that first described in Curitiba, in2003. In contrast, a single cluster of *A. baumannii* producing OXA-23 was found in São Luís city. Although there were previous reports regarding the spread of OXA-23-producing *A. baumannii* in Brazil the following features had not yet been assessed: i) the comparative analysis of OXA-23 producers genotypes originating in distinct and distant Brazilian cities, ii) the genetic location of the $bla_{\text{OXA-23}}$ gene and iii) the presence of IS*Aba1* upstream $bla_{\text{OXA-23}}$ probably resulting in high degree of carbapenem resistance. Thus, our study demonstrates that the clonal dissemination of OXA-23-producing *A. baumannii* had occurred in Brazil. These findings emphasize that infection control measures are urgently needed to reduce both the spread of multidrug resistant-strains and the number of infections caused by this pathogen.

The second study refers to a case report involving a hospitalized patient that presented an wound infection due to OXA-72-producing *A. baumannii*. The referred clinical isolate, A 30235, was resistant to most antibiotics tested and showed reduced susctptibility to ampicillin/sulbactam. Successful transformation assays using *A. baumannii* ATCC 19606 as the recipient strain revealed the plasmid location of the $bla_{\text{OXA-72}}$ gene. This plasmid showed molecular weight of about 86 Kb. We identified for the first time in Brazil, an *A. baumannii* clinical isolate producing OXA-72. The presence of this resistance determinant encoded by a gene located in a mobile genetic elemet, points out to an increasing diversity of OXA-type carbapenemase in Brazil with potential spread. Appropriate control measures should be taken to prevent the spread of OXA-72 producers among Brazilian hospitals, which it we have experienced with OXA-23-producing-*A. baumannii* in this country.

APRESENTAÇÃO

Nesta dissertação de mestrado são apresentados dois estudos que relatam a ocorrência das carbapenemases do tipo OXA, OXA-23-like e OXA-72, em isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes de diferentes cidades brasileiras. A realização destes estudos nos possibilitou escrever dois artigos, que foram submetidos ao periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

INTRODUÇÃO

Acinetobacter spp. são microorganismos amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados, por exemplo, em solo, água, animais e alimentos como, vegetais, carnes e peixes [Fournier & Richet, 2006; Houang *et al.*, 2001]. Pertencente à família *Moraxellaceae*, *Acinetobacter* spp. apresenta característica morfologica de cocobacilo Gram negativo, geralmente em formação diplóide ou em cadeias de comprimento variável, e motilidade negativa. Devido à morfologia destes microorganismos e dificuldades inerentes apresentada pela técnica de coloração de Gram, os isolados de *Acinetobacter* spp. podem ser erroneamente classificados como cocos Gram positivos. Rand & Tillan (2006) revisaram artigos com erros na interpretação desta técnica, em um período de 23 meses, e reportaram que 8 dos 68 (12%) pacientes com hemoculturas positivas para *Acinetobacter* spp., foram identificados erroneamente como cocos Gram positivos.

Bioquimicamente, os isolados de *Acinetobacter* spp. não fermentam a glicose, são estritamente aeróbicos, possuem reação de oxidase e catalase, negativa e positiva, respectivamente [Van Looveren *et al.*, 2004; Bergogne-Bérézin & Towner, 1996 e Dijkshoorn *et al.*, 2007]. Cerca de 30 espécies genômicas já foram propostas, das quais apenas 17 foram nomeadas como espécies [Van Looveren *et al.*, 2004].

O gênero *Acinetobacter* pode fazer parte da microbiota humana e desempenha um papel importante na etiologia das infecções adquiridas no ambiente hospitalar.

As espécies de *Acinetobacter lwoffii, Acinetobacter johnsonii, Acinetobacter junii*, *Acinetobacter* genoespécie 3, *Acinetobacter* genoespécie

15BJ e *Acinetobacter* genoespécie 11 podem ser encontradas na microbiota normal da pele humana, mucosa e fezes. *Acinetobacter baumannii, e*m contrapartida, raramente é encontrado na pele e nas fezes de pacientes comunitários. Porém a sua identificação nestes sítios é comum em pacientes hospitalizados por períodos prolongados [Corbella *et al*., 1996; Seifert *et al*., 1997; Berlau *et al*.,1999; Dijkshoorn *et al*., 2005].

Nas infecções nosocomiais, *Acinetobacter* spp. são agentes oportunistas e causadores de infecção de corrente sangüínea, infecção do trato urinário e meningite secundária, mas seu principal papel está relacionado como agente causador de pneumonia nosocomial, particularmente pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) [Bergogne-Bérézin & Towner, 1996]. A espécie clinica mais relevante é *A. baumannii*; entretanto, também tem sido descritos casos de infecções nosocomiais por *A. lwoffi* e *Acinetobacter baylyi* [Chen *et al.,* 2008; Murray *et al.* 2008; Rathinavelu *et al.* 2003].

No Brasil, *Acinetobacter* spp. é um dos principais agentes oportunistas causadores de infecção hospitalar. De acordo com o estudo de vigilância SENTRY (Programa de Vigilância Antimicrobiana) realizado entre 2003 e 2008, *Acinetobacter* spp. foi o terceiro e o sexto patógeno mais freqüentemente isolado de pacientes com pneumonia e infecções de corrente sangüínea, respectivamente [Andrade *et al*., 2008].

Infecções nosocomiais causadas por *Acinetobacter* spp. têm sido descritas no mundo todo, devido à (i) sua capacidade de sobreviver em superfícies secas, por ter pouca necessidade nutricional e viabilidade sob diferentes temperaturas, (ii) resistência aos desinfectantes, (iii) sua habilidade

em adquirir e propagar as carbapenemases da classe D e (iv) capacidade de associar a outros mecanismos de resistência. Estas características fazem de *Acinetobacter* spp. seres adaptáveis e desafiadores para médicos e pesquisadores na busca de uma combinação ideal para o tratamento de infecções causadas por estes patógenos. [Bonomo & Szabo, 2006; Getchell-White *et al.,* 1989; Jawad *et al.*, 1998; Wisplinghoff *et al.*, 2007].

Antimicrobianos como β-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, glicilciclinas e polimixinas podem ser eficazes no tratamento de *A. baumannii* [Karageorgopoulos & Falagas, 2008]. Entretanto, mutações no alvo de ação destes antibióticos, alteração da permeablidade da membrana externa e a inativação enzimática podem ocasionar a resistência a várias destas drogas [Karageorgopoulos & Falagas, 2008; Peleg *et al.*, 2008; Bonomo & Szabo, 2006].

Entre os β-lactâmicos, os carbapenêmicos constituem uma das principais opções terapêuticas de infecções causada por bactérias Gram negativas, por apresentar potente atividade *in vitro* e estabilidade contra a maioria das β-lactamases [Nicolau,2008]. Porém, com o surgimento das enzimas do tipo carbapenemases (metaloenzimas e oxacilinases), tem comprometido a eficácia deste grupo de antimicrobianos.

As oxacilinases (OXAs) foram primeiramente descritas por sua capacidade em hidrolisar a cloxacilina e a oxacilina mais eficientemente que as benzilpenicilinas [Bush *et al.*, 1995]. No entanto, algumas variantes de OXAs caracterizadas posteriormente hidrolisavam fracamente ou mesmo não hidrolisavam estes antimicrobianos [Poirel *et al.*, 2010]. Algumas oxacilinases apresentam atividade carbapenemase e, por este motivo são também

denominadas CHDLs (*Carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamases*). Porém, a eficiência hidrolítica destas enzimas contra os carbapenêmicos é baixa quando àquelas conferidas pelas metalo-β-lactamases (MβLs), o que pode complicar a sua detecção pelos laboratórios de rotina [Poirel & Nordmann, 2006]. As carbapenemases do tipo OXA podem ser constitutivas, em uma dada espécie, ou adquiridas. A família OXA 51-like, por exemplo, ocorre naturalmente em *A. baumannii*. As carbapenemases do tipo OXA adquiridas em *Acinetobacter* spp. podem ser divididas em quatro subgrupos, de acordo com sua sequência de aminoácidos: OXA 23-like, OXA 24/40-like, OXA 58-like e OXA-143.

No Brasil existem poucos estudos relacionados à ocorrência das carbapenemases do tipo OXA em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. Estes se restringem a isolados de regiões específicas. Deste modo, para a melhor compreensão da epidemiologia de *Acinetobacter* spp. produtores de carbapenemases do tipo OXA, seria interessante um estudo que avaliasse isolados clínicos provenientes de diferentes cidades brasileiras. Esta abordagem permitiria o melhor entendimento da distribuição de possíveis clones circulantes, com o intuito de compreender como ocorreu a disseminação destes isolados, e como medidas de controle poderiam ser implementadas para reduzir a disseminação destes determinantes de resistência entre estes patógenos.

Além disso, até o momento, somente duas carbapenemases do tipo OXA foram descritas em *Acinetobacter* spp. no Brasil, OXA 23-like e a recente OXA-143. A recente detecção de uma OXA-24/40-like em um isolado clínico de *A. baumannii* proveniente de São Paulo trouxe uma preocupação quanto ao aumento da diversidade das carbapenemases do tipo OXA em isolados clínicos

Acinetobacter spp., levando assim, a mais um estudo, onde se caracterizou o gene *bla* $_{\text{OXA 24/40-like}}$ encontrado.

OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização genética de isolados clínicos de *A. baumannii* produtores de carbapenemases do tipo OXA, recuperados em diferentes cidades brasileiras.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos nos isolados clínicos avaliados;

- Investigar a presença de carbapenemases do tipo OXAs e metalo-β-lactamase nos isolados clínicos avaliados;

- Investigar a presença da seqüência de inserção (IS*Aba1*), à montante dos genes codificadores de carbapenemases do tipo OXA;

- Avaliar a localização do gene $bla_{\text{OXA-23-like}}$ nos genótipos de *A. baumannii* produtores de OXA-23 mais freqüentemente encontrados.

- Relatar e caracterizar o gene $bla_{\text{OXA-24/-40-like}}$ em *A. baumannii* multiresistente isolado da hemocultura de um paciente internado no Hospital São Paulo.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Patógeno

Acinetobacter spp. são geralmente intrinsecamente resistentes a aminopenicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda gerações e cloranfenicol [Vila *et al.*, 1993; Seifert *et al.*, 1993]. As associações de antimicrobianos ampicillin/sulbactam, cefoperazona/sulbactam, carbapenêmicos, polimixina B e E, piperacilina/tazobactam, tigeciclina e aminoglicosídeos constituem as opções terapêuticas mais comuns para o tratamento das infecções causadas por *Acinetobacter* spp. [Hujer *et al.*¸ 2005; Michalopoulos & Falagas, 2010].

Entre estas diferentes classes de antimicrobianos, os β-lactâmicos, agentes que interferem com a síntese do peptídeoglicano, se destacam por apresentar grande diversidade em termos de propriedades químicas, de espectro de ação e segurança, devido a raros efeitos colaterais. Segundo Livermore & Woodford (2006), penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos representam 60% do uso global total de antimicrobianos. No entanto, os índices de resistência a esta classe de drogas, incluindo os carbapenêmicos, vem aumentando gradativamente ao longo dos anos.

Antes dos anos 70, ainda era possível tratar infecções por espécies de *Acinetobacter* com uma variedade de antibióticos, como, os aminoglicosideos; β-lactâmicos, especialmente os carbapenêmicos; e as tetraciclinas [Bergogne-Berezin & Towner, 1996]. A resistência aos carbapenêmicos, por sua vez, começou a ser observada a partir de 1985 e surtos de infecções hospitalares

por estes patógenos resistentes começaram a ser descritos nos anos 90 [Dijkshoorn *et al.*, 2007].

Em 1992/1993 um surto em um hospital de São Paulo causado por *A. baumannii* multirresistente foi responsável pela morte de 80% dos pacientes, sobrevivendo apenas os pacientes que apresentavam infecção do trato urinário [Levin *et al.*, 1996]. Estudos mais atuais descrevem isolados clínicos de *A. baumannii* que apresentam sensibilidade a um único agente antimicrobiano ou, ainda, que apresentaram resistência a todas as opções terapêuticas disponíveis [Falagas & Bliziotis, 2007].

Lewis e colaboradores (2000) reportaram resultados do Programa SENTRY envolvendo isolados de pacientes com pneumonia, coletados em 1998, de 10 centros médicos da América Latina. *Acinetobacter* spp. foi o quarto patógeno mais isolado, e a taxa de resistência destes isolados ao imipenen e meropenem foi de 18.7% para ambos compostos, enquanto para tetraciclina esta taxa foi um pouco maior, 22.7%. Estes dados representavam um grande motivo para preocupação, visto que em um estudo anterior do mesmo programa, foram observadas taxas de resistência inferiores para imipenen (9.6%), meropenem (9.6%) e tetraciclina (10.6%) entre os isolados de *Acinetobacter* spp. [Lewis *et al.*, 2000].

Também como parte do programa SENTRY, Andrade e colaboradores descreveram que entre 2003 e 2008 nos hospitais brasileiros, *Acinetobacter* spp. foi o terceiro patógeno mais freqüentemente isolado em pacientes com pneumonia e o sexto de pacientes com infecção de corrente sanguínea, pele e tecidos moles. Estes isolados apresentaram taxas de resistência próximas a

24% para os carbapenêmicos, sendo que apenas a polimixina B apresentou atividade contra 100% dos isolados.

Mecanismos mutacionais de impermeabilidade que promovem a redução do acúmulo intracelular destas drogas e alteração do alvo contribuem para a resistência aos β-lactâmicos. Porém, as β-lactamases, enzimas capazes de clivar o anel β-lactâmico destes agentes, constituem a maior ameaça à utilização terapêutica desta classe de antimicrobianos [Livermore & Woodford, 2006]. Entre os fatores que contribuíram para o sucesso das β-lactamases, destacam-se: a crescente diversidade tanto em termos de estrutura, como de espectro de atividade, e a localização dos genes que as codificam em elementos genéticos móveis, passíveis de transferência horizontal [Poirel & Nordmann, 2002; Poirel *et al.*, 2008b). Segue abaixo a descrição e classificação destas enzimas.

2. β-lactamases

β-lactamases são enzimas que hidrolizam a ligação amida do anel β-lactâmico, tornando-o inativo. Algumas β-lactamases utilizam íons de zinco para interromper esta ligação, mas a maior parte, opera via produção de ésteres de serina. São encontradas em espécies Gram positivas, na parte extracelular e, dependendo das condições de crescimento, algumas enzimas podem encontrar-se aderidas na membrana citoplasmática. Em espécies Gram negativas, são encontradas no espaço periplasmático, embora possa ocorrer liberações enzimáticas extracelulares. A capacidade das β-lactamases em conferir resistência, depende da localização, cinética, quantidade e condições físico-químicas [Livermore, 1995].

Devido ao crescente número de β-lactamases identificadas e à diversidade de características bioquímicas e moleculares, diferentes esquemas de classificação destas enzimas foram propostos ao longo dos anos.

Em 1980, AMBLER propôs classificar às β-lactamases com base em sua seqüência de aminoácidos em quatro classes moleculares principais: A) serino β-lactamases, incluindo as β-lactamases de espetro ampliado (ESBLs), penicilinases e carbenicilinases; B) metalo-β-lactamases; C) cefalosporinases cromossomais; e D) oxacilinases [Ambler, 1980].

Em 1989, BUSH propôs uma classificação na qual correlacionava o substrato preferencial e propriedades inibitórias à estrutura molecular da enzima [Bush, 1989a; Bush, 1989b]. Em 1995, BUSH, JACOBY e MEDEIROS propuseram uma atualização da classificação inicial de BUSH que combinava características estruturais e funcionais das β-lactamases [Bush et al., 1995]. Em 2010, foi realizada outra atualização da classificação anterior, incluindo novos subgrupos (Tabela 1). O sistema de classificação permaneceu igual ao anterior, no qual enzimas foram agrupadas com base na sua capacidade de hidrolisar classes específicas de β-lactâmicos e na inativação pelos inibidores. Uma lista de atributos também foi sugerida para uma adequada caracterização de novas β-lactamases, incluindo propriedades microbiológicas, substratos preferenciais, perfis de inibição e sequência molecular dos genes que as codificam [Bush & Jacoby, 2010].

A grande diversidade das β-lactamases pode estar relacionada, i) à ampla variedade de nichos ambientais, onde as bactérias estão sujeitas a diferentes pressões seletivas; ii) ao papel funcional que muitos genes de resistência aos

antimicrobianos apresentam em seus reservatórios naturais; iii) à mobilização de genes de resistência em elementos genéticos móveis; iv) às trocas de materiais genéticos entre bactérias, seja da mesma ou de diferentes espécies, podendo ocorrer até mesmo entre bactérias de gêneros distintos; e v) à constante adaptação à presença de antimicrobianos no meio, evitando assim, os ataques por estes compostos. Portanto, as β-lactamases continuarão a evoluir e esquemas de classificação deverão ser constantemente atualizados [Bush & Jacoby, 2010].

Tabela 1. Esquema de classificação das β-lactamases adaptada da tabela original Bush & Jacoby – 2010.

Grupo Bush-Jacoby/2009	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros/ 1995	Classe Molecular Ambler	Características	Enzimas Representativas
1	1	C	Hidrolisa melhor cefalosporinas que benzilpenicilinas; hidrolisa também as cefamicinas. Não são inibidas pelo AC ou TZB e EDTA	*E. coli* AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI		Aumento na hidrólise de ceftazidima e outros oxyimino-β-lactâmicos. Não são inibidas pelo AC, TZB e EDTA	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Hidrolisa melhor benzilpenicilinas que cefalosporinas. Inibida por AC ou TZB	PC1
2b	2b		Hidrólise similar das benzilpenicilinas e das cefalosporinas. Inibidas pelo AC ou TZB	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be		Aumento na hidrólise de oxyimino- β-lactâmicos, tais como cefotaxima, ceftazidima, cetriaxona, cefepina e aztreonam. Inibidas pelo AC ou TZB	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br		Resistência à AC, sulbactam e TZB	TEM-30, SHV-10
2ber	NI		Aumento na hidrólise de oxyimino β-lactâmicos combinado com a resistência à AC, sulbactam e TZB	TEM-50
2c	2c		Aumento na hidrólise de carbenicilina. Inibidas pelo AC ou TZB	PSE-1, CARB-3
2ce	NI		Aumento na hidrólise de carbenicilina, cefepima e cefpiroma. Inibida pelo AC ou TZB	RTG-4
2d	2d	D	Aumento na hidrólise da cloxacilina ou da oxacilina. Inibição variável pelo AC ou TZB	OXA-1, OXA-10
2de	NI		Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e oxyimino- β-lactâmicos. Inibição variável pelo AC ou TZB	OXA-11, OXA-15
2df	NI		Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos. Inibição variável pelo AC ou TZB	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Hidrolisa cefalosporinas. Inibida pelo AC, mas não por aztreonam.	CepA
2f	2f		Aumento na hidrólise de carbapenêmicos, oxyimino- β-lactâmicos e cefamicinas. Inibição variável pelo AC ou TZB	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Hidrolisa de β-lactâmicos de amplo espectro, incluindo os carbapenêmicos, mas não os monobactans. Inibidas pelo EDTA	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)		L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Hidrólise preferencial de carbapenêmicos. Inibidas pelo EDTA	CphA, Sfh-1
NI	4	Desconhecida		

AC – Ácido clavulânico TZB – Tazobactam NI – Não incluso

3. β-lactamases em *Acinetobacter* spp.

As β-lactamases são importantes componentes do arsenal de resistência antimicrobiana em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. Na espécie *A. baumannii,* por exemplo, foram descritas mais de 50 enzimas diferentes [Dijkshoorn *et al.*, 2007]. As β-lactamases presentes em isolados de *Acinetobacter* spp., descritas abaixo, foram organizadas segundo a nova classificação de Bush & Jacoby (2010). Estas enzimas se encontram resumidas na Tabela 2.

3.1 Cefalosporinases cromossomais (Grupo 1 - Bush/Jacoby 2010)

AmpC são enzimas que geralmente apresentam massa molecular de 34-40 kDa e ponto isoelétrico (pI) de aproximadamente 8.0. [Philippon *et al.*, 2002]. São enzimas cromôssomais em *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* e algumas *Enterobacteriaceae*. Hidrolisam com grande eficiência as penicilinas, as cefamicinas e com menor eficiência, aztreonam e as cefalosporinas de terceira geração. Geralmente, as cefalosporinas de quarta geração e os carbapenêmicos são fracamente hidrolisados pelas enzimas do tipo AmpC [Jacoby, 2009; Ni *et al.*, 2005].

A síntese cromossomal de AmpC em alguns Gram negativos como, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* e *P. aeruginosa* pode ser induzível pelos genes *ampR* e *ampD*. Entretanto, Bou & Martínez-Beltrán em 2000(a), descreveram que, a síntese de AmpC em *A. baumannii*, não estava relacionada com o gene regulador, *ampR*, e que testes de indução com cefoxitina não foram capazes de induzir a produção de AmpC. Portanto, a enzima AmpC em

amostras de *Acinetobacter* spp. não é induzível, sendo geralmente expressa em baixos níveis. Pórem, o aumento da expressão da AmpC pode ocorrer quando existir a presença de uma sequência de inserção (IS), tal como IS*Aba1*, à montante do gene que codifica a AmpC. Tal hiperexpressão é dirigida por seqüências promotoras presentes nestes elementos de inserção [Corvec *et al.*, 2003; Héritier *et al.*, 2006].

Existem variantes da β-lactamase AmpC descritas em *Acinetobacter* spp. Hujer e colaboradores (2005) propuseram uma denominação uniforme para esta família de β-lactamase: ADC (*Acinetobacter derived cephalosporinase*). Entretanto, até momento, estes termos não são amplamente empregados ou são usados em combinação com classificação de Ambler, classe C/AmpC β-lactamase.

Em 2010, Rodríguez-Martínez e colaboradores descreveram a primeira cefalosporinase de amplo espectro em um isolado de *A. baumannii*, nomeada de ADC-33. Esta variante apresentava eficiente atividade hidrolítica sobre ceftazidima, cefepima e aztreonam, enquanto praticamente não hidrolisavam os carbapenêmicos [Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010].

3.2 β-lactamases de espectro limitado (Gupo 2; subgrupo 2b – Bush/Jacoby 2010)

As enzimas do subgrupo 2b conferem resistência às penicilinas e às cefalosporinas de primeira e segunda geração. Estão incluídas neste subgrupo as enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1, que são fortemente inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam. Geralmente, os genes que codificam estas enzimas estão localizados em plasmídios [Bush & Jacoby, 2010].

Devaud e colaboradores (1982) descreveram a produção da enzima TEM-2 em isolados de *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus*, relacionados a uma epidemia de infecções do trato respiratório em um hospital da Suíça. Estes isolados apresentavam resistência às penicilinas e aos aminoglicosídeos. Em 1993, na Espanha, 54 isolados clínicos de *A. baumannii* foram avaliados e destes, 16% apresentaram a β-lactamase do tipo TEM-1 [Vila *et al.*, 1993]. As enzimas TEM-1 e TEM-2 são prevalentes em *A. baumannii*; entretanto, atualmente a presença destas enzimas têm significado clínico limitado, devido ao maior espectro de substratos apresentados por outros determinantes de resistência também freqüentemente encontrados nestes patógenos [Peleg *et al.*, 2008].

3.3 β-lactamases de amplo espectro - ESBL (Grupo 2; subgrupo 2be Bush/Jacoby 2010)

As β-lactamases de amplo espectro (ESBL) apresentam atividade hidrolítica contra as penicilinas e uma ou mais oximino-lactâmicos, como a cefotaxima, a ceftazidima e o aztreonam [Bush & Jacoby, 2010].

Entre junho e novembro de 2000, isolados de *Enterobacter cloacae* resistentes aos aminoglicosídeos e β-lactamase de amplo espectro foram coletados de 10 pacientes em um hospital da Holanda. Medidas de controle, não foram suficientes para evitar a recorrência de clones ocasionados por *A. baumannii* com semelhante perfil de resistência. Ambos os surtos apresentaram um plasmídio conjugativo similar, que carregava os genes, SHV-12, TEM-116 e outros genes que conferiam resistência aos aminoglicosídeos [Naiemi *et al.*, 2005]. Huang e colaboradores (2004) também relataram a ocorrência do gene

SHV-12, em isolados de *A. baumannii* do distrito Huzhou e província de Zhejiang na China, utilizando a análise do DNA plasmidial.

Em 2007, Endimiani e colaboradores investigaram, em um período de 7 anos na Itália, a presença de determinantes genéticos de resistência, e relataram que de 470 isolados clínicos de *A. baumannii,* 31 carregavam o gene bla_{TEM-92}.

A enzima SHV-5 foi descrita em um isolado de *A. baumannii* pela primeira vez na cidade de Nova York, em 2007. Antes desta descrição, a produção desta enzima era somente relatada em *Enterobacteriaceae* [Nass *et al.*, 2007].

Em 1983, Knothe e colaboradores descreveram pela primeira vez um plasmídio conjugativo que carregava um determinante de resistência à cefotaxima em isolados de *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens* [Knothe *et al.*, 1983]. Entretanto, só em 1987 que, Sirot e colaboradores estudaram os mecanismos bioquímicos e a base genética da resistência à cefotaxima, em um surto de infecções causadas por *K. pneumoniae* na França, a enzima responsável pela hidrólise foi denominada pelos autores de CTX-1 [Sirot *et al.*, 1987]. Nagano e colaboradores (2004) relataram a presença de um plasmídio que carregava o gene $bla_{CTX-M-2}$ em três amostras de *A. baumannii* isoladas de aspirado traqueal. Este plasmídio apresentava o mesmo contexto genético observado no isolado de *Proteus mirabilis* relatado previamente [Nagano *et al.*, 2004; Nagano *et al.*, 2003].

A ESBL do tipo PER apresenta cerca de 30% de identidade com as sequências de aminoácidos das ESBLs do tipo TEM e SHV [Bauernfeind *et al.*, 1996; Nordmann & Nass, 1994]. PER-1 hidrolisa eficientemente as penicilinas e

as cefalosporinas e tem a sua atividade inibida pelo ácido clavulânico. A primeira amostra de *Acinetobacter* spp. produtora de PER foi observada na Turquia, onde era a enzima mais prevalente, com a presença do gene em 46% (n=72) dos isolados de *Acinetobacter* spp. em um estudo realizado em 1997 [Vagaboglu *et al.*, 1997]. Além da Turquia, a presença desta enzima também foi descrita na Ásia por Yong e colaboradores, em 2003. A enzima PER-2 foi encontrada em isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes da Argentina [Pasterán *et al.*, 2006; Celenza G *et al.*, 2006].

A ESBL do tipo VEB-1 apresenta 38% de identidade com a sequência de aminoácidos das enzimas PER-1 e PER-2. Esta enzima confere resistência à ceftazidima, à cefotaxima e ao aztreonam e é inibida pelo ácido clavulânico. Foi encontrada pela primeira vez em um isolado de *E. coli*, recuperado de uma criança vietnamita de 4 meses de idade [Poirel *et al.*, 1999]. Em 2003 e 2006 foram descritos dois relatos desta enzima em cepas de *A. baumannii,* isolados na França [Poirel *et al.*, 2003; Naas *et al.*, 2006]. Entre esse período, a enzima VEB-1a também foi descrita em várias cidades argentinas [Pasterán *et al.*, 2006]. A variante VEB-3 foi relatada somente em amostras de *Acinetobacter* spp. provenientes de Taiwan [Huang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010].

3.4 Carbenicilinase (Grupo 2; subgrupo 2c e 2ce – Bush/Jacoby 2010)

As enzimas do subgrupo 2c hidrolisam carbenicilina com a mesma eficiência com que hidrolisam a benzilpenicilina. Estas enzimas, denominadas carbenicilinases hidrolisam fracamente a cloxacilina e a oxacilina e são inibidas pelo ácido clavulânico [Bush & Jacoby, 2010]. Esta família possui 10 variantes com propriedades hidrolíticas similares e são divididas em dois subgrupos,

CARB e RTG, de acordo com sua sequência de aminoácidos. As CARBs possuem menos de 50% de identidade com as sequências de aminoácidos das enzimas SHV e TEM [Choury *et al.*, 2000]. Geralmente são codificadas por cassetes gênicos inseridos em integrons da classe 1. Por outro lado, pouco se conhece sobre o contexto genético das enzimas RTG [Potron *et al.*, 2009].

Joly-Guillo e colaboradores, em 1988, estudaram 100 isolados clínicos de *A. calcoaceticus* coletados no período de 1981 a 1986 e encontraram 9% dos isolados apresentando penicilinase do tipo CARB (CARB-5). Em 2000, Choury e colaboradores, estudaram a sequência de nucleotídeos do gene $bla_{\text{CARB-5}}$ e demonstraram que a enzima codificada por este gene pertencia ao subgrupo das enzimas do tipo RTG, possível antepassado da família carbenicilinase, sugerindo assim, o nome de RTG-2.

Em 2007, foi descrita uma nova carbenicilinase, SCO-1, encontrada em isolados de *E. coli*, na Grécia. Esta enzima apresenta 51% de identidade com a sequência de aminoácidos das enzimas do subgrupo RTG e 40% com as ezimas TEM, SHV e CTX-M [Papagiannitsis *et al.*, 2007, Poirel *et al.*, 2007]. Paralelamente, esta enzima foi identificada em isolados de *Acinetobacter* spp. produtores de VEB-1a ou PER-2 provenientes da Argentina. A caracterização bioquímica de SCO-1 revelou alta atividade hidrolítica contra as penicilinas, mas não contra as cefalosporinas e os carbapenêmicos. A enzima SCO-1 não está descrita na nova classificação de Bush-Jacoby/2009, por ter 51% de identidade com a sequência de aminoácidos do subgrupo RTG, esta enzima foi acrescentada nesta revisão, na tabela 2, junto com este subgrupo, conforme descrito no estudo de Papagiannitsis e colaboradores (2007).

O novo subgrupo, 2ce, surgiu devido a um estudo recente, de uma nova enzima do tipo RTG, a RTG-4 (CARB-10), encontrada em um isolado clínico de *A. baumannii.* Esta enzima hidrolisa mais eficientemente cefepima e cefpiroma do que ceftazidima e cefotaxima, pertencendo assim, a um novo subgrupo de amplo espectro do tipo RTG. Esta nova enzima não apresentou atividade hidrolítica sobre imipenem [Potron *et al.*, 2009].

3.5 Oxacilinases (Gupo 2; subgrupo 2d , 2de, 2df – Bush/Jacoby 2010)

As β-lactamases de classe molecular D são também conhecidas como oxacilinases ou β-lactamases do tipo OXA (OXAs). Estas enzimas apresentam em seu sítio ativo um resíduo serina, assim como observado nas enzimas das classes A e C de Ambler.

A maior parte das oxacilinases é capaz de hidrolisar cloxacilina e oxacilina mais eficientemente do que a benzilpenicilina e hidrolisam significativamente as amino e carboxipenicilinas. Uma característica marcante deste grupo de enzimas é o fato de serem fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, mas fortemente inibidas, *in vitro*, pelo cloreto de sódio [Poirel *et al.*, 2009].

No final dos anos 70 e início dos anos 80, as oxacilinases representavam uma das famílias mais prevalentes, cujos genes codificadores eram carregados por plasmídios [Matthew *et al.*, 1979; Medeiros *et al.*, 1984; Simpson *et al.*, 1980; Queenan *et al.*, 2007]. Embora a maioria dos genes que codificam as enzimas do tipo OXA estejam localizados em plasmídios, alguns podem ocorrer naturalmente no cromossomo de certas bactérias Gram negativas [Poirel *et al.*, 2009].

Atualmente o grupo das OXAs possui cerca de 180 enzimas descritas (http://www.lahey.org/Studies), as quais apresentam grande divergência bioquímica e molecular. A classe D é dividida em três subgrupos, segundo a nova classificação de Bush & Jacoby (2010). No subgrupo 2d estão incluídas as OXAs que possuem espectro limitado; no subgrupo 2de estão as OXAs de amplo espectro (ES-OXAs) e no subgrupo 2df inclui as denominadas OXAs que hidrolisam os carbapenêmicos (carbapenemases do tipo OXA) [Bush & Jacob, 2010].

3.5.1 Oxacilinases de espectro limitado (Gupo 2; subgrupo 2d – Bush/Jacoby 2010)

As enzimas do subgrupo 2d, hidrolisam significativamente as amino e ureidopenicilinas e fracamente as cefalosporinas. Estas enzimas podem ser adquiridas, sendo que os genes que as codificam estão normalmente localizados em integrons carregados por plasmídios, ou contitutivas, com genes localizados no cromossomo. Estas enzimas foram descritas em vários países e em uma variedade de isolados Gram negativos.

Segundo Poirel e colaboradores (2009), de acordo com a identidade de seqüência de aminoácidos as oxacilinases de espectro limitado podem ser divididas em quatro subgrupos, i) OXA-1/-30; ii) OXA-2 e variantes (OXA-3, OXA-15, OXA-21, OXA-32, OXA-34, OXA-36 e OXA-53); iii) OXA-10 e variantes (OXA-11, OXA-13, OXA-16, OXA-28, OXA-35 e OXA-74); e iv) outros. Até o momento foram somente descritas em *Acinetobacter* spp. as enzimas OXA-20, OXA-37 do subgrupo outros; e OXA-21, pertencente ao subgrupo OXA-2. Nestas descrições os isolados foram recuperados em países Europeus e os

genes codificadores das oxacilinases identificadas estavam localizados em integrons da classe 1.

3.5.2 Carbapenemases do tipo OXA (Gupo 2; subgrupo 2df – Bush/Jacoby 2010)

O subgrupo 2df é representado pelas carbapenemases do tipo OXA, que possuem atividade hidrolítica, ainda que fraca, contra os carbapenenêmicos. Estas enzimas são divididas em dez famílias, sendo elas: OXA-23-*like*, OXA-24/40-*like*, OXA-48-*like,* OXA-50, OXA-51-*like*, OXA-55-*like,* OXA-58-*like*, OXA-60, OXA-62 e OXA-143, de acordo com a sequência de aminoácidos [Bush & Jacoby, 2010; Walther-Rasmussem & Hoiby, 2006; Schneider *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2009]. Algumas enzimas são constitutivas de certas espécies de *Acinetobacter*, como é o caso de OXA-51-*like* em *A. baumannii* e OXA-23-*like* em *A. radioresistans.* É importante ressaltar, no entanto, que as enzimas dos tipos, OXA-51 e OXA-23 também podem ser adquiridas por espécies de *Acinetobacter* que não as apresentam constitutivamente. Outras carbapenemases do tipo OXA, adquiridas incluem OXA-24/40-*like*, OXA-58-*like* e OXA-143.

Assim como observado para as enzimas do tipo AmpC, a hiperexpressão de OXA-23-like, OXA-51-like ou OXA-58-like pode estar relacionada à presença de uma IS (Figura 1), geralmente a IS*Aba*1, à montante do gene que codificam tais enzimas. Neste caso é observado aumento da expressão destes genes e níveis mais elevados de resistência aos carbapenêmicos [Dijkshoorn *et al.*, 2007; Nordmann & Poirel, 2002].

Cinco famílias de carbapenemases do tipo OXA adquiridas foram descritas em *Acinetobacter* spp., com uma maior freqüência em isolados de *A. baumannii.* Segue as descrições destas cinco famílias adquiridas e duas famílias intrínsicas deste microorganismo.

3.5.2.1 Subgrupo OXA-23-like

A enzima OXA-23 ou ARI-1 foi o primeiro grupo descrito das carbapenemases do tipo OXA, em 1993, de um isolado de *A. baumannii* em Edimburgo na Escócia. O isolado foi coletado em 1985 e apresentou resistência ao imipenem, às penicilinas e às cefalosporinas. Curiosamente, o imipenem não estava disponível clinicamente, na Escócia, nesta época [Paton *et al.*, 1993]. Em 1995, outro estudo com o mesmo isolado, conseguiu transferir o plasmídio que continha o gene de resistência ao imipenen para uma cepa de *A. junii* [Scaife *et al.*, 1995]. Em 2000, foi realizada a análise da sequência da ARI-1, que apresentou 36% de identidade com a sequência de aminoácidos das enzimas OXA-5 e OXA-10. A enzima ARI-1 passou a se chamar OXA-23 [Donald *et al.*, 2000].

Após a descoberta da OXA-23, variantes desta enzima, tais como, OXA-27, OXA-49, OXA-134, OXA-146 e OXA-133 foram descritas em *Acinetobacter* spp. (Figura 2) [www.lahey.org/Studies]. Com exceção da variante OXA-73, que foi sequenciada em 2004, a partir de uma amostra de *Klebsiella pneumoniae*, isolada na Austrália e da OXA-23 encontrada em *P. mirabilis* na França, todas as enzimas deste subgrupo foram descritas em *Acinetobacter* spp. [GenBank accession nº. AY762325; Bonnet *et al.*, 2002].

Em 2008, um estudo foi conduzido com o objetivo de analisar o possível progenitor do gene *bla*$_{OXA-23-like}$ em *Acinetobacter* spp. Os pesquisadores envolvidos observaram que todos os isolados de *Acinetobacter radioresistens* da coleção analisada carregavam o gene *bla*$_{OXA-23-like}$ em seu cromossomo, e sugeriram ser esta, a espécie progenitora deste determinante de resistência [Poirel *et al.*, 2008a]. Os autores também sugeriram que, assim como *A. baumannii* e *A. radioresistens* possuem naturalmente em seu cromossomo os genes *bla*$_{OXA-51-like}$ e *bla*$_{OXA-23-like,}$ respectivamente, outras espécies de *Acinetobacter* podem agir como reservatórios naturais de outras carbapenemases do tipo OXA encontrada neste espécie [Poirel *et al.*, 2010].

Em 2009, Mendes e colaboradores descreveram a presença de uma variante da enzima OXA-23-like cromossomal, OXA-133, em um isolado clínico *A. radioresistens.* Neste mesmo isolado também foi observado outra cabapenemase do tipo OXA, OXA-58, localizada em plasmídio.

Após estas descobertas, outras variantes da enzima OXA-23-like cromossomal, OXA-102, -103, -105, -134 foram identificadas em *A. radioresistens* [Poirel *et al.*, 2010; GenBank accession nº. FJ195387].

3.5.2.2 Subgrupo OXA-24/40-like

A OXA-24 foi originalmente identificada em *A. baumannii* na Espanha, cujo gene codificador presuntivamente, se localizava no cromossomo [Bou *et al.*, 2000b]. Posteriormente, foi descrita a OXA-40, uma enzima relacionada à OXA-24. No entanto, estudos posteriores identificaram erros no seqüenciamento de *bla*$_{OXA-40}$, indicando que a enzima codificada por aquele gene era idêntica à OXA-24 [www.lahey.org/Studies]. Esta enzima é endêmica na Península Ibérica

e já foi identificada em isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes de várias cidades dos Estados Unidos [Lopez *et al.*, 2002; Lolans *et al.*, 2006].

O gene $bla_{OXA-24/40}$ já foi identificado tanto no cromossomo bacteriano quanto em plasmídios [Lolans *et al.*, 2006]. Geralmente, OXA-24/40 é encontrada em *Acinetobacter* spp., entretanto, existe a descrição de sua produção por dois isolados de *P. aeruginosa* na Espanha [Sevillano *et al.*, 2009]. Depois da descoberta da OXA-24/40, variantes desta enzima foram descritas, OXA-25, OXA-26, OXA-72 e OXA-33 em *Acinetobacter* spp. (figura 2).

3.5.2.3 Subgrupo OXA-51-like

A enzima OXA-51 foi descrita pela primeira vez, em 2005, de duas amostras de *A. baumannii* isoladas na Argentina [Brown *et al.*, 2005]. Posteriormente, estudos determinaram a natureza intrinsica desta enzima em *A. baumannii* [Heritier *et al.*, 2005a].

Semelhante a outras carbapenemases do tipo OXA, OXA-51-like hidrolisa os carbapenêmicos em baixos níveis, sendo que sua expressão basal não contribui significativamente para a resistência a esta classe de antimicrobianos. O nível alto de resistência parece estar relacionado com a presença da (IS), IS*Aba*1 ou IS*Aba-9,* à montante ao gene [Figueiredo *et al.*, 2009a; Figueiredo *et al.*, 2009b].

Após a descoberta desta enzima, 48 variantes deste grupo já foram descritas até 2009 (Figura 2) [Poirel *et al.*, 2010; www.lahey.org/Studies; blast.ncbi.nlm.nih.gov].

Recentemente Lee e colaboradores descreveram um isolado clínico de *Acinetobacter* genoespécie 13TU resistente aos carbapenêmicos, que carregava o gene $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ em plasmídio. O elemento de inserção, IS*Aba*1, apresentou-se à montante do gene. Análise das sequências vizinhas ao gene sugeriram que, a enzima OXA-51-like encontrada nesta espécie, foi originária de *A. baumannii* [Lee *et al.*, 2009].

3.5.2.4 Subgrupo OXA-58-like

O gene $bla_{OXA\text{-}58}$ foi primeiramente descrito em um isolado de *A. baumannii*, na França, apresentando uma atividade hidrolítica contra as penicilinas, oxacilinas, imipenem, mas não as cefalosporinas de amplo espectro. Este isolado compartilhou menos de 50% de identidade com a sequência de aminoácidos de outros membros do grupo OXA [Pirel *et al.*, 2005]. Esta enzima possui duas variantes descritas, OXA-96 e OXA-97 (figura 2).

A enzima OXA-58 tem sido relatada em outras espécies de *Acinetobacter,* como *A. junii* na Romênia e Australia [Marqué *et al.*, 2005; Peleg *et al.*, 2006], *Acinetobacter* genoespécie 3 na Espanha [Marti *et al.*, 2008a] e *Acinetobacter* phenon 6/ct13TU na Espanha [Marti *et al.*, 2008b].

3.5.2.5 Subgrupo OXA-143

A OXA-143 é a enzima mais recentemente descrita das carbapenemases do tipo OXA adquiridas em *A. baumannii*. Esta enzima foi isolada no Brasil em 2004 e conferiu resistência às penicilinas, às oxacilinas, ao meropenem e ao imipenem, entretando, não apresentou atividade sobre as cefalosporinas de amplo espectro. A enzima OXA-143 foi nomeada como um novo subgrupo das β-lactamases da classe D, por apresentar somente 88%, 63% e 52% de

identidade com as sequências de aminoácidos da OXA-40, OXA-23 e OXA-58, respectivamente (figura 1) [Higgins *et al.*, 2009].

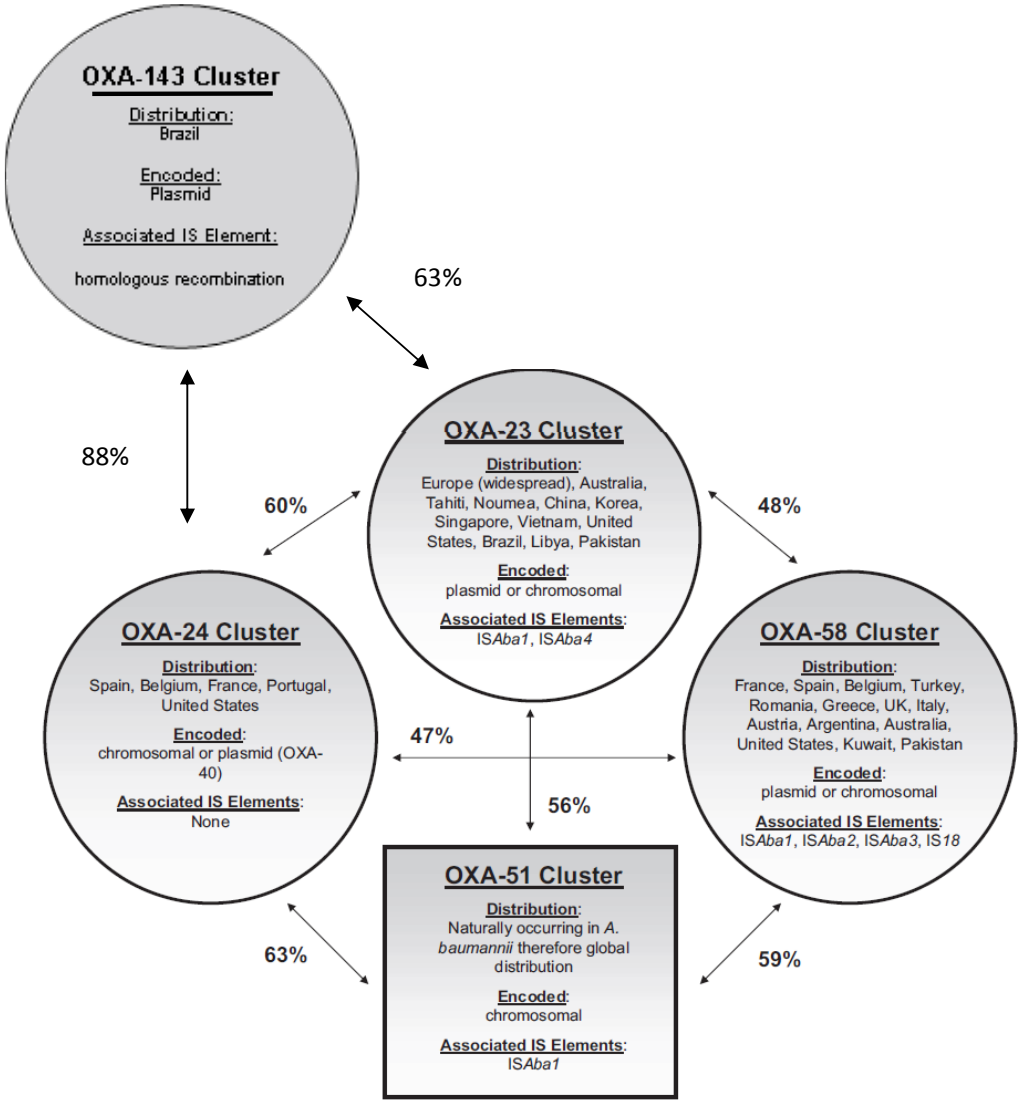

Figura 1. Distribuição e contexto genético das oxacilinases em *A.baumannii*. As setas correspondem à porcentagem de identidade da sequência de aminoácidos entre as famílias. Os círculos correspondem às famílias de carbapenemases do tipo OXA adquiridas e o quadrado, à família carbapenemase do tipo OXA constitutiva [adaptada de Peleg *et al.*, 2008].

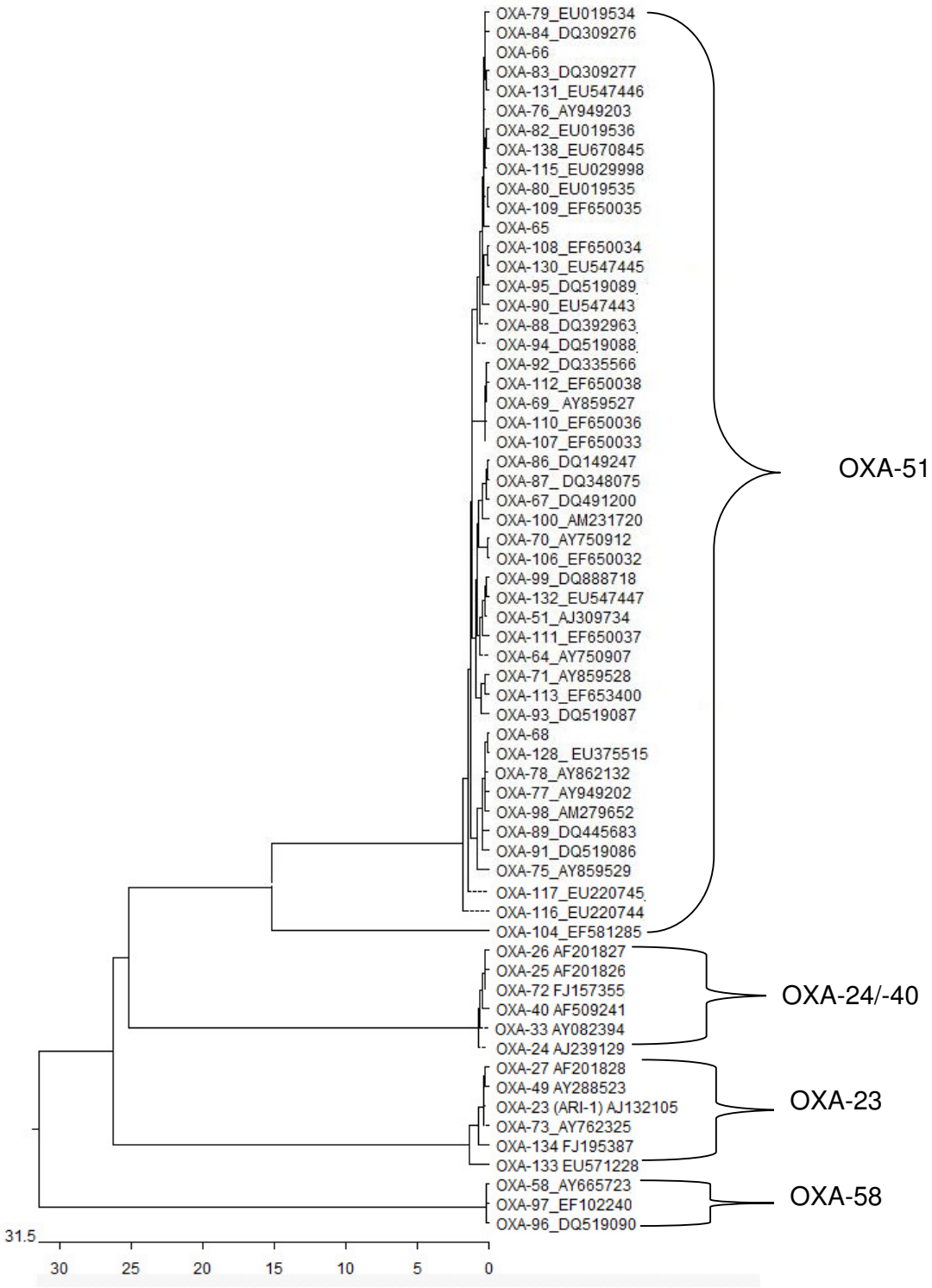

Figura 2. Árvore filogenética dos quatro subgrupos de carbapenemases do tipo OXA (2009)*

* A enzima OXA-143 foi descrita após a concretização da árvore filogenética.

3.6 Carbapenemases (Gupo 2; subgrupo 2f – Bush/Jacoby 2010)

As β-lactamases classificadas no grupo funcional 2f apresentam resíduos serina em seus sítios ativos, são sensíveis à ação dos inibidores de serino-β-lactamases e são capazes de hidrolisar os carbapenêmicos. As enzimas SME, IMI e NMC são representantes do subgrupo 2f cromossomal e foram, até o momento, descritas unicamente entre membros da família *Enterobacteriaceae*. As enzimas KPC e algumas enzimas GES (ex-IBC) são as mais preocupantes do subgrupo 2f, pois os genes que as codificam estão inseridos em plasmídios [Bush & Jacoby, 2010].

A família GES/ICB foi descrita pela primeira vez em 2000, com relatos de IBC-1 (*integron-borne cephalosporinase*) em um isolado *E. cloacae* na Grécia [Giakkoupi *et al.*, 2000]. No mesmo período, uma amostra de *K. pneumoniae*, isolada de um swab retal em 1998, de uma paciente de 1mês de idade, transferida de um hospital da Guiana Francesa para França, conferiu resistência a cefalosporinas de amplo espectro e recebeu o nome de GES-1 (*Guiana extended-spectrum beta-lactamase*) [Poirel *et al.*, 2000]. A enzima GES tem uma característica própria, em que substituições de aminoácidos no sítio ativo pode ampliar a atividade hidrólítica da enzima, que passa a hidrolisar os carbapenenêmicos. A única GES descrita até o momento em *A. baumannii*, foi a GES-11, na França. Esta variante conferiu resistência aos β-lactâmicos, incluindo aztreonam e redução na sensibilidade aos carbapenêmicos. O gene bla_{GES-11} estava localizado em um integron de classe 1 [Moubareck *et al.*, 2009].

A enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) por sua vez, foi descrita em 2001 nos Estados Unidos e, após sua descoberta, enterobactérias produtoras de enzimas do tipo KPC foram descritas em diversas regiões dos continentes americano, europeu e asiático. Até a realização do presente estudo, onze variantes de KPC-1 haviam sido descritas, sendo que KPC-1 e KPC-2 correspondem à mesma enzima [Nordmann *et al.*, 2009; www.lahey.org/Studies].

Até recentemente, acreditava-se que a disseminação de enzimas do tipo KPC estivesse restrita aos membros da família *Enterobacteriaceae*. Entretanto, isolados de *P. aeruginosa* produtores de enzimas do tipo KPC já foram identificados em alguns países da América Latina, como Colômbia, Trinidad e Tobago e Porto Rico [Villegas *et al.*, 2007b; Akpaka *et al.*, 2009; Wolter *et al.*, 2009]. Além disso, em 2010, Robledo e colaboradores descreveram, pela primeira vez, a presença das enzimas KPC-2, -3, -4 e -10 em isolados de *Acinetobacter* do complexo *calcoaceticus-baumannii* recuperados em Porto Rico.

3.7 Metalo-β-lactamases (MBLs, Grupo 3 – subgrupo 3a Bush/Jacoby 2010)

As metalo-β-lactamases (MBL) classificadas no grupo funcional 3 e subgrupo 3a são enzimas que apresentam potente atividade contra os carbapenêmicos, mas diferem de outras carbapenemases em três principais aspectos: (i) geralmente requerem íons Zn^{+2} ou outros cátions divalentes como cofator no sítio ativo; (ii) são resistentes à ação dos inibidores das serino β-lactamases, embora sofram inibição por agentes quelantes como o EDTA,

derivados do tiol e ácido dipicolínico; e (iii) não hidrolisam o monobactam aztreonam [Walsh *et al.*, 2005].

Algumas MBLs são produzidas constitutivamente por espécies bacterianas tais quais *Bacillus cereus*, *Bacteriodes fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp. e *Flavobacterium meningosepticum* [Nordmann & Poirel, 2002]. Contudo, desde o início da década de 90, aquisição de MBLs vem sendo descrita em patógenos clinicamente mais importantes, como espécies de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* e enterobactérias.

Nove famílias de MBLs já foram descritas, sendo elas: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM, KHM e NDM-1 [Juan *et al.*, 2010]. Destas nove famílias, somente três foram identificadas em *Acinetobacter* spp.: IMP, VIM e SIM.

Em 1994 foi descrita a primeira IMP-1 em um isolado clínico de *Serratia marcescens* no Japão [Osano *et al.*, 1994]. O primeiro membro da família IMP encontrado em um isolado de *A. baumannii,* foi em 2000, na Itália, sendo chamada de IMP-2. O gene que codificava esta enzima estava localizado na primeira posição da região variável de um integron da classe 1, o qual por sua vez localizava-se no cromossomo bacteriano [Riccio *et al.*, 2000].

No Brasil, um estudo envolvendo isolados de *Acinetobacter* spp. isolados no período de 1993 a 2001, demonstrou que a produção de IMP-1 no Hospital São Paulo surgiu em 1998. Neste estudo foi observado que vários genótipos produtores de IMP estavam presentes [Tognim *et al.*, 2006].

Em 2003, Chu e colaboradores, descreveram IMP-4 em *Acinetobacter* spp. na China. Esta enzima apresentava 95,6% e 89,3% de identidade com as sequências de aminoácidos da enzima IMP-1 e IMP-2, respectivamente [Chu *et*

al., 2001]. O gene *bla*$_{IMP-4}$ foi descrito na China, Australia, Singapura e Malásia [Houang *et al.*, 2000; Peleg *et al.*, 2006; Koh *et al.*, 2007; Hwa *et al.*, 2009].

A variante IMP-5 foi descrita somente em Portugal em um isolado de *A. baumannii* coletado em 1998 [Da Silva *et al.*, 2002]. Outra variante descrita foi a IMP-8, em 2006, em um isolado de *Acinetobacter* spp. na China. Esta enzima tinha sido somente encontrada neste país, mas recentemente foi descrita em Taiwan [Wang e*t al.*, 2007; Huang *et al.*, 2010].

Em 1999, foi descrita a primeira enzima da família VIM, VIM-1, em um isolado clínico de *P. aerugionosa,* do Hospital Universitário de Verona, Itália, o gene *bla*$_{VIM-1}$ foi encontrado inserido em um integron de classe 1. Em *A. baumannii*, a VIM-1, tem sido descrita somente na Grécia e localizada em integron de classe 1. Entretanto, uma descrição mais recente, demonstrou localização cromossomal do gene *bla*$_{VIM}$ nesta mesma espécie [Tsakris *et al.*, 2006; Ikonomidis *et al.*, 2008; Loli *et al.*, 2008].

Em 2002, foi descrito o primeiro relato de VIM-2, em onze isolados de *A. baumannii* e dois em *Acinetobacter* genoespécie 3 na Coréia, o gene *bla*$_{VIM-2}$ foi carreado por um integron [Yum *et al.*, 2002]. O gene *bla*$_{VIM-2}$ tem sido descrito em *Acinetobacter* spp. no extremo Oriente e na Alemanha [Lee *et al.*, 2003; Toleman *et al.*, 2004]. As variantes, VIM-4 e VIM-11, foram encontradas em isolados de *Acinetobacter* spp. coletados na Grécia e Taiwan, respectivamente [Figueiredo *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2008].

Em 2005, foi descrita pela primeira vez a enzima SIM em sete isolados de *A. baumannii* em Seul, Coréia. O gene *bla*$_{SIM-1}$ estava localizado em integron de

classe 1. Os isolados pertenciam a duas linhagens clonais, indicando uma transferência horizontal deste gene [Lee *et al.*, 2005].

Recentemente, Lee e colaboradores, relataram a presença da enzima SIM-1 em isolados de *Acinetobacter* genoespécie 10, estes apresentando integrons com dois tipos diferentes de MBLs, mostrando que os genes bla_{IMP-1}, bla_{VIM-2} e bla_{SIM-1} podem coexistir nesta espécie [Lee *et al.*, 2010]. A enzima SIM-1 foi encontrada até o momento somente na Coréia do Sul.

Tabela 2. β-lactamases identificadas em *Acinetobacter* spp. (adaptado de Zavascki *et al.*, 2010).

Grupo Bush-Jacoby (2009)	Classe Molecular Ambler	Enzimas	Referência
1	C	AmpC	Hujer *et al.*, 2005
2b	A	TEM-1, TEM-2	Vila *et al.*, 1993; Davaud *et al.*, 1982
2be	A	PER-1, PER-2	Vagabogly *et al.*, 1997; Pasterán *et al.*, 2006
		VEB-1, VEB-1a, VEB-3	Poirel *et al.*, 2003/2006; Naas *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008
		TEM-92, TEM-116	Endimiani *et al.*, 2007; Naiemi *et al.*, 2005
		SHV-5, SHV-12	Nass *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2004
		CTX-M-2	Nagano *et al.*, 2002
2f	A	GES-11	Moubareck *et al.*, 2009
		KPC-2, -3, -4, -10	Robledo *et al.*, 2010
2c	A	RTG-2 (CARB-5), CARB-8, SCO-1	Joly-Guillo *et al.*, 1988; Choury *et al.*, 2000; Poirel *et al.*, 2007
2ce		RTG-4 (CARB-10)	Potron *et al.*, 2009
2d	D	Espectro estrito: OXA-2, -20, -21, -37	Vila *et al.*, 1997; Giordano *et al.*, 2007; Navia *et al.*, 2002
2df		carbapenemase produzidas naturalmente: OXA-51-like, OXA-23-like	Heritier *et al.*, 2005a; Poirel *et al.*, 2010
		carbapenemase - adquiridas: OXA-23-like (ARI-1), -24/-40-like, -58 e -143	Paton *et al.*, 1993; Bou *et al.*, 2000b; Poirel *et al.*, 2005; Higgins *et al.*, 2009
3a	B	IMP-1, -2, -4, -5, -8, -11	Tognim *et al.*, 2000; Chiu *et al.*, 2010; Riccio *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; AB074436
		VIM-1, -2, -3, -4, -11	Tsakris *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2003; Figueiredo *et al.*, 2008
		SIM-1	Lee *et al.*, 2005

4. Outros mecanismos

Além das β-lactamases, existem outros mecanismos que contribuem para a resistência antimicrobiana em *Acinetobacter* spp., como a diminuição da permeabilidade da membrana externa, o aumento da expressão de bombas de efluxo ou a interação entre ambos os mecanismo, através de um sinergismo, que ocorre entre o efeito das bombas de efluxo e a permeabilidade da membrana externa [Zgurskaya *et al.*, 2000].

4.1 Impermeabilidade da membrana externa – OMPs

As bactérias Gram negativas apresentam em torno do seu peptidiogligano uma membrada externa, que tem como principal papel servir como barreira de permeabilidade, evitando assim, a entrada de substâncias tóxicas e, ao mesmo tempo, permitindo o efluxo das moléculas de nutrientes. A membrana externa contém proteínas transmembrana (OMP) que formam verdadeiros canais, denominadas porinas. Estas porinas permitem o trânsito de substrâncias hidrofílicas de baixo peso molecular através da membrana externa e são importantes para entrada de agentes antimicrobianos na célula bacteriana. A perda ou diminuição da expressão destes canais podem conferir às bactérias diferentes níveis de resistência a certos antimicrobianos. [Martí *et al.*, 2006; Zavascky *et al.*, 2010; Nikaido, 2003].

Pouco se sabe sobre as porinas relacionadas à resistência a β-lactâmicos em *A. baumannii*. Segundo Vila e colaboradores, uma das limitações para estudá-las é a ausência de informações relativas às OMPs, nesta espécie, e suas propriedades. Peleg e colaboradores descreveram também sobre a dificuldade em compará-las com precisão e, assim, relacionar a perdas das

OMPs com a resistência bacteriana [Vila *et al.,* 2007; Peleg *et al.*, 2008]. Cuenca e colaboradores (2003) estudaram as OMPs de *A. baumannii* por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob diferentes condições, e descreveram a presença de 10 principais OMPs nesta espécie.

Os estudos sobre OMPs em *Acinetobacter* spp. encontram-se descritos abaixo, e também foram relacionados na Tabela 3.

A principal OMP de *A. baumannii* é uma proteina monomérica conhecida como *heat-modifiable protein* (HMP)-AB, que apresenta poros grandes permitindo a passagem de solutos com peso de até 800 Da. Seu peso molecular foi estimado a 43 kDa com aquecimento do extrato e 37kDa sem aquecimento. A comparação de sua sequencia revelou homologia com outras proteínas monoméricas, como a OmpA de Enterobactéria e OprF de *Pseudomonas* spp. [Gribun *et al.*, 2003; Nitzan *et al.*, 1999]

Limansky e colaboradores (2002) demonstraram que a resistência a imipenem em *Acinetobacter* spp., não produtor de carbapenemase, estava associada à perda de uma proteína de 29 kDa, designada CarO. Resultado semelhante também foi observado por Mussi e colaboradores (2005), no qual a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* estava associada à perda da mesma proteína. A análise do banco de dados, deste estudo, demonstrou que a CarO foi encontrada somente em membros da família *Moraxellaceae*. Nenhum sítio de ligação ao imipenem pôde ser detectado nesta proteína e, portanto, acredita-se que esta porina seja um canal inespecífico de entrada para os carbapenêmicos [Vila *et al.*, 2007]. Em associação a CarO, foi encontrada uma

outra proteína, conhecida como Omp25. Embora ambas apresentem parâmetros físico-químico similares, a Omp25 não é capaz de formar canais, apesar de apresentar função sugestiva de porina [Siroy *et al.*, 2005].

A proteína OmpW, encontrada em *A. baumannii,* pertence a família das pequenas proteínas monoméricas, como a OmpA de *E.coli*, com um peso molecular de 22 kDa. O substrato específico desta proteína ainda não foi determinado, entretanto, ela pode estar envolvida no transporte de pequenas moléculas. A OmpW apresenta homologia com a proteína OprG da família *Pseudomonaceae* [Siroy *et al.*, 2006]

Outras duas porinas podem estar envolvidas na resistência aos carbapenêmicos, a proteína de 33-36 kDa [Tomás *et al.*, 2005] e a proteína de 43 kDa, que demonstra homologia peptídica com a OprD de *P. aeruginosa* [Dupont *et al.*, 2005]. Diferente da CarO, a proteína de 43 kDa (OprD) é um canal específico para os carbapenêmicos [Vila *et al.*, 2007].

Tabela 3. Proteínas de membrana externa presentes em *Acinetobacter* spp. (adaptado de Zavascki *et al.*, 2010).

Omp	Omp Familia	Peso Molecular (kDa)	Substratos
HMP-AB	OmpA	43-37	β-lactâmicos
CarO	CarO	29	β-lactâmicos
	OprD	43	Imipenem
Omp33/36		33-36	Carbapenêmicos
OmpW		22	Não determinado

4.2 Hiperexpressão da bomba de efluxo

A membrana externa, em Gram negativos, limita a entrada de agentes antimicrobianos na célula, enquanto as bombas de efluxo exportam múltiplas classes de antimicrobianos para fora da célula, trabalhando assim, em sinergismo. Um exemplo desse sinergismo ocorre quando, uma bactéria apresenta baixa permeabilidade da membrana externa e hiperexpressão da bomba de efluxo, os antimicrobianos são expelidos para fora da célula e para entrar novamente, terão que tentar atravessar a baixa permeabilidade da membrana externa [Poole, 2002; Vila *et al.*, 2007].

Os sistemas de efluxo, além de acomodar uma variedade de antimicrobianos em bactérias Gram negativas, também exportam outros componentes como detergentes, pigmentos, biocidas e hidrocarbonetos aromáticos. Estes sistemas são agrupados em seis famílias: ABC (*ATP binding cassette)*, MFS (*major facilitator superfamily)*, SMR (*smal multidrug resistance)*, MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), RND (*resistance-nodulation division*) e DMT (*drug/metabolite transporter*), que estão distribuidas tanto em bactérias Gram negativas, quanto em bactérias Gram positivas [Poole, 2002].

Nove sistemas de efluxo já foram descritos em *Acinetobacter* spp., AdeABC, AdeIJK, Tet(A), Tet(B), AbeM, AdeDE, AdeXYZ, CraA e AdeFGH. Os estudos que reportam sistemas em *Acinetobacter* spp. encontram-se descritos abaixo, e também foram relacionados na Tabela 4.

Em *A. baumannii*, a bomba de efluxo AdeABC, intrínsica neste microrganismo, pertencente a família RND e talvez seja a mais importante e conhecida. Quando ativa, é responsável pela resistência às fluoroquinolonas, à

tetraciclina, ao cloranfenicol, à eritromicina, ao trimetropim e ao brometo de etídio [Magnet *et al.*, 2001]. A hiperexpressão desta bomba de efluxo em *A. baumannii* também tem contribuído significativamente para o aumento no nível de resistência aos carbapenêmicos e tigeciclina [Heritier *et al.*, 2005b]. Este sistema é formado por três proteínas: AdeB que forma o componente *trans*-membrana na membrana interna, AdeA que forma a proteína periplasmática de fusão, e AdeC que forma a proteína de membrana externa. O sistema AdeABC é regulado por dois componentes conhecidos como AdeR e AdeS. Mutações simples nestes componentes estão associados à hiperexpressão do sistema AdeABC levando a multirresistência em *Acinetobacter* spp. [Marchand *et al.*, 2004]. Entretando, Ruzin e colaboradores (2007) identificaram a desrepressão do gene *adeS* através da inserção do elemento IS*Aba1*.

O sistema de efluxo AdeIJK, demonstra ser intrínsico em *A. baumannii*. Pertencente à família RND é formado por três proteínas: AdeJ componente *trans*-membrana que pertence a mesma família da AcrB de *E. coli*, AdeI que forma proteína periplasmática de fusão, e AdeK, proteína de membrana externa. Este sistema de efluxo confere resistência aos β-lactâmicos, ao cloranfenicol, à tetraciclina, à eritromicina, às lincosamidas, às fluoroquinolonas, ao ácido fusídico, à novobiocina, à rifampicina, ao trimetoprim, à acridina, à safranina, à pironina e ao dodecil sulfato de sódio. Como o sistema de efuxo AdeABC, AdeIJK contribui mais ativamente na resistência à tigeciclina [Damier-Piolle *et al.*, 2008].

Os sistema AdeDE e AdeXYZ são encontrados predominantemente no grupo genômico de DNA 3 em *Acinetobacter*, que é considerado o grupo genômico clinicamente mais relevante em todo o mundo. AdeDE confere

resistência à amicacina, à ceftazidima, ao cloranfenicol, às fluorquinolonas, à eritromicina, ao meropenem, à tetraciclina e à rifampicina, já a hiperexpressão do sistema de efluxo AdeXYZ, não foi relacionado à resistência antimicrobiana até o momento (Koh *et al.*, 2007).

O sistema de efluxo AbeM tem sido descrito mais recentemente em *A. baumannii*, pertence a família MATE, seu espectro antimicrobiano inclui a gentamicina, a ciprofloxacina, a eritromicina, o trimetoprim e outros compostos tóxicos. A contribuição deste sistema para a resistência antimicrobiana em isolados clínicos permanece ainda desconhecida [Su *et al.*, 2005].

A resistência às tetraciclinas, em Gram negativos, pode ser mediada pelas bombas de efluxo tet(A) e tet(B) em *A. baumannii*. O sistema tet(A) confere resistência à tetraciclina, mas não à minociclina, de caráter adquirido, sendo encontrado dentro de um transposon em associação a sequências de inserção [Ribera *et al.*, 2003; Peleg *et al.*, 2008]. Os sistema tet(A) e tet(B) foram descritos, pela primeira vez, por Guardabassi e colaboradores (2000), que estudaram os mecanismos de resistência às tetraciclinas em isolados clínicos e também isolados de ambientes aquáticos. Os autores observaram que nos isolados clínicos os sistemas TetA e TetB foram frequentes, diferente do observado para os isolados aquáticos, nos quais os determinantes genéticos responsáveis pela resistência à tetraciclina não foram identificados.

Roca e colaboradores (2009) descreveram a presença de uma bomba de efluxo da família MFS, intrínsica em *A. baumannii*, que era relacionada à resistência ao cloranfenicol. Este sistema foi descrito somente na Espanha e recebeu a denominação de CraA (*Chloramphenicol resistance Acinetobacter*).

Recentemente, um terceiro sistema RND chamado AdeFGH foi encontrado em um isolado de *A. baumannii*, conferindo uma maior resistência às fluoroquinolonas, à tigeciclina, à tetraciclina, ao cloranfenicol, à clindamicina, ao trimetoprim/sulfametoxazol, ao dodecil sulfato de sódio e aos corantes. Mutações no gene regulador chamado *adeL*, demonstrou ser o responsável pela hiperexpressão de AdeFGH [Coyne *et al*, 2010].

Tabela 4. Sistemas de efluxo em isolados de *Acinetobacter* spp. (adaptado de Zavascki *et al.*, 2010).

Sistema de Efluxo	Família Bomba de Efluxo	Localização do Gene	Substratos*	Referências
AdeABC	RND	Cromossomal	AMG,FQ,TET,TGC,CLO,TMP,ERI,MEM	Magnet *et al.*, 2001
AdeIJK	RND	Cromossomal	BL,CLO,TET,ERI,LIN,FQ,FAC,NOV, RIF,TMP	Damier-Piolle *et al.*, 2008
AbeM	MATE	Não determinada	GEN, CIP, ERI, TRI	Su *et al.*, 2005
Tet (A)	MFS	Transposon	TET	Peleg *et al.*, 2008
Tet (B)	MFS	Transposon	TET	Peleg *et al.*, 2008
AdeDE	RND	Não determinada	AMI, CAZ,CL, FQ,ERI, MEM, TET,RIF	Koh *et al.*, 2007
AdeXYZ	RND	Não determinada	Não determinado	Koh *et al.*, 2007
CraA	MFS	Cromossomal	CLO	Roca *et al.*, 2009
AdeFGH	RND	Cromossomal	FQ, TGC, TET, CLO, CLI, TMP, SUL	Coyne *et al.*, 2010

* AMG, aminoglicosídeo; BL, β-lactâmico; CAZ, ceftazidima; CLI, clindamicina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; FAC, ácido fusídico; FQ, fluorquinolona; GEN, gentamicina; LIN, lincosamida; MATE, m*ultidrug* e *toxic compound extrusion*; MEM, meropenem; MFS, m*ajor facilitator superfamily*; NOV, novobiocina; RIF, rifampicina; SUL, sulfametoxazol; RND, r*esistance-nodulation division*; TET, tetraciclina; TGC, tigeciclina; TMP, trimetoprim.

5. Epidemiologia das carbapenemases do tipo OXA em *Acinetobacter* spp.

A. baumannii tem causado numerosos surtos de infecções nosocomiais [Perez *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2010; Mugnier *et al.*, 2010] envolvendo, principalmente, pacientes internados em UTI [Saeed *et al.*, 2006]. Uma variedade de surtos causados por este patógeno foi descrito, desde surtos causados por apenas um único clone e envolvendo mais de um hospital, como descrito por Dalla-Costa e colaboradores (2003) até surtos causados por múltiplos clones (policlonais), como reportado por Marchaim e colaboradores (2007). Surtos decorrentes da transferência de pacientes de uma região com alta taxa de resistência antimicrobiana para outra com baixa taxa de resistências também foram observados (Onarheim *et al.*, 2000). Além disso, infecções epidêmicas puderam ser observadas, por Villers e colaboradores (1998), coexistindo com infecções endêmicas, favorecidas pela pressão antimicrobiana hospitalar.

Na última década, houve um aumento mundial nas taxas de resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Acinetobacter* spp. Este fenótipo tem sido relacionado, principalmente, à aquisição e à produção de três tipos de carbapenemases do tipo OXAs, OXA-23-like, OXA-24-like e OXA-58-like [Poirel *et al.*, 2006].

A enzima OXA-23-like tem sido descrita por todo o mundo. Mugnier e colaboradores (2010) descreveram a disseminação desta enzima em vinte isolados de *A. baumannii* de 15 paises, sendo que um dos isolados coletado de uma infecção de ferida, em 2006, era originário do Brasil. Os autores realizaram

a Tipagem molecular destes isolados por seqüenciamento de Múltiplos *Loci* (MLST) e identificaram 8 tipos de sequências, dos quais quatro representavam novos MLST tipos, o isolado brasileiro foi um dos novos MLST tipo (ST15) encontrado no estudo. A localização do gene bla_{OXA-23} nos isolados foi observada tanto no DNA cromossomal como em DNA plasmidial, e estes estavam associados a quatro estruturas gênicas: Tn*2006*, Tn*2007*, IS*Aba1* e Tn*2008*. O gene bla_{OXA-23} do isolado brasileiro foi localizado em um plasmídio de peso molecular de 130 kb e apenas uma cópia do elemento de inserção, IS*Aba1*, foi encontada à montante deste gene [Mugnier *et al.*, 2010].

Enzimas do tipo OXA-24 têm sido descritas na Península Ibérica, nos Estados Unidos, na China, na Coréia do Sul, em Taiwan e no Bahrein [Lopez *et al.*, 2002; Lolans *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2010]. Gene do tipo bla_{OXA-58} têm sido descritos em *A. baumannii* isolados na França, Bélgica, Itália, Turquia, Grécia e Estados Unidos [Poirel *et al.*, 2010].

Na Europa, a disseminação de três clones relacionados em distintas áreas geográficas tem sido descritas e associadas à multirresistência em *A. baumannii*. Estes foram desginados como clone I, II e II. Os Clones I e II podem ser encontrados em países do noroeste da Europa, Espanha e África do Sul, entretanto, não se encontram limitados a estes países. O clone I também pode ser recuperado da Polônia e Itália e o clone II de Portugal, França, Grécia e Truquia. O clone III foi encontrado na França, Holanda, Itália e Espanha [van Dessel *et al.*, 2004].

5.1 Epidemiologia na América Latina

Em 2003, Dalla-Costa e colaboradores, descreveram o primeiro surto causado por *A. baumannii* produtor de OXA-23 do Brasil e da America Latina. Este surto envolveu oito isolados clínicos multirresistentes coletados de dois hopitais terciários universitários da cidade de Curitiba em 1999. Os isolados pertenciam a um único clone, demonstrando a ocorrência da disseminação inter-hospitalar naquela cidade. Recentemente, Schimith Bier e colaboradores (2010) avaliaram a persistência deste primeiro clone de *A. baumannii* produtor de OXA-23 identificado na cidade de Curitiba. Para este estudo, isolados clínicos de *A. baumannii* coletados nos mesmos hospitais envolvidos no estudo anterior foram avaliados. Todos os isolados recuperados apresentavam a enzima OXA-23. Três distintos clones foram encontrados, sendo um deles similar ao encontrado em 1999. Os autores sugerem que a transmissão horizontal de plasmídios carregando $bla_{\text{OXA-23}}$ desempenhou um papel importante na disseminação do mesmo e contribuiu para o aumento nas taxas de resistência a imipenem, entre os isolados de *Acinetobacter* spp.

Villegas e colaboradores (2007) descreveram o isolamento de *A. baumannii* que carregavam os genes $bla_{\text{OXA-23}}$ e $bla_{\text{OXA-51}}$ em sete hospitais terciários na Colômbia. Este estudo demonstrou a disseminação de quatro clones, sendo um deles presente em cidades diferentes.

Na Argentina, em 2008, Merkier e colaboradores estudaram amostras de *A. baumannii* isoladas entre os anos 1995 e 2006, que apresentavam sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos. Este estudo relatou a produção, de

88% (n=41) dos isolados, das enzimas OXA-23 e/ou OXA-58. Foi observada, ainda, a presença de IS à montante dos genes bla_{OXA-23} e bla_{OXA-58}.

Em 2009, Carvalho e colaboradores, descreveram uma disseminação de isolados clínicos de *A. baumannii* multirresistentes, na cidade do Rio de Janeiro. Estes isolados foram coletados entre os anos 2006 e 2007 de oito hospitais fluminenses. 87.3% (n=110) dos isolados apresentaram o gene bla_{OXA-23}. Dois clones foram prevalentes, sendo um deles disseminado em sete hospitais e o outro em cinco hospitais.

Em Porto Alegre, disseminação do gene bla_{OXA-23} foi primeiramente descrita em 2009, em isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes de dois hospitais universitários terciários. Dois clones principais foram encontrados em ambos os hospitais, sendo que um deles, também foi encontrado no ambiente (aparelho móvel de RX, prateleira da enfermaria e mesa ao redor da cama de um colonizado) ocorrendo assim, uma possível disseminação em ambos os sentidos, entre paciente e ambiente para paciente [Martins *et al.*, 2009].

Mostashio e colaboradores (2009) desenvolveram uma metodologia modificada da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes codificadores de carbapenemases. Para o desenvolvimento da técnica, os autores utilizaram amostras de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos de 4 hospitais de São Paulo, isoladas entre os anos de 2002 e 2008. Além das amostras resistentes, também foram utilizadas amostras sensíveis e cepas controle previamente caracterizadas. Um total de 64 *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos foi estudado, sendo que todos os isolados apresentaram a amplificação do gene $bla_{OXA-51-like}$, 22 (34%) isolados

apresentaram o gene $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$ e 4 isolados, o gene $bla_{IMP.}$ O elemento de inserção IS*Aba1* foi detectado na grande maioria dos isolados resistentes aos carbapenêmicos, com excessão de uma única cepa [Mostachio *et al*., 2009].

ARTIGO I

Artigo enviado ao periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, em 10 de novembro de 2010, conforme documento em anexo (Anexo I, página 100).

Dissemination of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clones in distinct Brazilian cities

Jéssica S. Werneck[1*], Renata C. Picão[1], Raquel Girardello[1], Rodrigo Cayô[1], Vitor Marguti[1], Libera M. Dalla-Costa[2], Ana C. Gales[1]

[1] *Laboratório ALERTA, Division of Infectious Diseases, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil;*

[2] *Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC), Curitiba, Brazil*

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, resistance mechanism, OXA-type carbapenemase

Running title: Dissemination of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil

***Corresponding author**. Mailing address: Laboratório ALERTA, Rua Pedro de Toledo, 781 6º andar, fundos. Vila Clementino, São Paulo-SP. CEP 04039-032. Phone/Fax: 55-11-5576-4748. E-mail: jessica.s.werneck@gmail.com

ABSTRACT

Objective: The principal aim of this study was to evaluate the genetic relatedness of OXA-23-producing *A. baumannii* isolated from distinct Brazilian hospitals.

Methods: As part of a surveillance study, 91 *A. baumannii* clinical isolates were collected from seventeen hospitals located in the eight cities distributed in three Brazilian regions. MICs were determined by CLSI broth microdilution. Detection of OXA-type-carbapenemases- and metallo-β-lactamases-encoding genes was performed by multiplex PCR followed by amplicon sequencing. Molecular typing of OXA-23-producing *A. baumannii* isolates was assessed by PFGE. The location of the bla_{OXA-23} was attempted by hybridization assays using bla_{OXA-23} specific labeled probes.

Results: Eight-three out of 91 (91.2%) isolates were resistant to carbapenems. The bla_{OXA-23} gene was identified in 83.5% of the whole collection. Nine clusters were observed among OXA-23 producers. One cluster was predominant (cluster A, 36.8% of the whole collection), being identified in six cities. Clusters B (17.1%) and D (9.2%) were also found in more than one location, while cluster I (5.3%) was exclusively found in the Brazilian Northeast.

Conclusions: Three main clusters of OXA-23-producing *A. baumanni* seem to have successfully spread throughout the Brazilian territory. Such OXA-23 producers showed increased resistance rates to other antimicrobials, not included in the hydrolytic spectrum of this enzyme, possibly indicating that concomitant dissemination of other mechanisms of resistance had occurred.

INTRODUCTION

Acinetobacter spp. is a nosocomial pathogen that has been reported worldwide. According to a previous epidemiological survey conducted in Brazilian hospitals, *Acinetobacter* spp. was the third and the sixth most frequent pathogen recovered from patients with pneumonia and bloodstream infections, respectively.[1] Although carbapenems represent the first therapeutic option for treatment of serious *Acinetobacter baumannii* infections, their efficacy has been compromised by both the overexpression of their natural carbapenemase OXA-51 and/or the acquired carbapenem-hydrolysing class-D β-lactamases (CHDLs). According to their amino acid sequences, the CHDLs in *Acinetobacter* spp. are divided into four clusters: OXA 23-like, OXA 24/40-like, OXA 58-like and OXA-143-like.[2]

OXA-23 was first characterized from an *A. baumannii* clinical isolate recovered in Scotland, in 1985. Subsequently, OXA-23 variants such as OXA-27, OXA-49, OXA-102, OXA-103, OXA-105 and OXA-133 have been described in *Acinetobacter* spp. from several countries.[2] Noteworthy, OXA-23-like enzymes was also identified in *Enterobacteriaceae* clinical isolates such as *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae*.[2]

OXA-23-producing *A. baumannii* isolates have been previously identified in Brazil.[3-5] However, in these reports the genetic relationship of OXA-23-producing *A. baumannii* isolates collected from different cities was not studied. In addition, neither the presence of IS*Aba1* upstream bla_{OXA-23} nor the location of bla_{OXA-23} was previously evaluated. The aim of our study was to assess the genetic relatedness of OXA-23-producing *A. baumannii* isolated from seventeen

hospitals located in eight Brazilian cities. We also attempted to determine the location of *bla*$_{OXA-23}$ and to evaluate the presence of IS*Aba1* upstream *bla*$_{OXA-23}$ among carbapenem-resistant isolates.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates. In a previous surveillance study, 17 private hospitals were asked to refer Gram-negative bacilli causing nosocomial-acquired infections to a monitoring laboratory (Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, LEMC, UNIFESP, São Paulo, Brazil). Hospital-acquired infections were defined according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) criteria. A total of 803 Gram-negative isolates were collected between January and December 2008 from diverse body sites of infections. Among them, 91 (11.3%) *A. baumannii* were collected and characterized in this study. Only a single isolate per patient was evaluated.

Participant medical centers. Medical centers were located in the cities of São Paulo (5 hospitals, 29 isolates), Rio de Janeiro (4 hospitals, 16 isolates), Belo Horizonte (2 hospitals, 10 isolates), Porto Alegre (2 hospitals, 15 isolates), Blumenau (1 hospital, 8 isolates), Curitiba (1 hospital, 7 isolates), São Luiz (1 hospital, 4 isolates) and Salvador (1 hospital, 2 isolates).

Susceptibility testing. Susceptibility testing was performed by broth microdilution, according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).[6] Quality control was conducted using *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 strains. The difference in the antimicrobial resistance rates between OXA-23 producers and non-OXA-

23 producers was accessed by the *t*-Student test. Statistical significance was defined as *p* value <0.05.

Carbapenemase activity. Carbapenemase activity was investigated in crude extracts of carbapenem-resistant isolates by a spectrophotometric assay. Imipenem was used as substrate and the measurements were carried out at 297 nm, as previously described.[7]

Detection of carbapenemase-encoding genes and IS*Aba1*. The detection of metallo-beta-lactamases- and CHDLs-encoding genes was performed by multiplex PCR, using previously published primers and cycling conditions.[8,9] The CHDL-positive isolates were submitted for an additional PCR targeting both the insertion sequence IS*Aba1* (5'-GTCAGTTGCACTTGGTCG-3') and the CHDL-encoding gene identified. All amplicons obtained were purified using PCR purification columns (Qiagen, Courtaboeuf, France) and submitted to DNA sequencing on ABI 3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster city CA). The nucleotide and deduced protein sequences were analyzed with software available over the internet at the National Center for Biotechnology Information website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

PFGE analysis. Genetic relatedness among OXA-23-producing *A. baumannii* was evaluated by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) using ApaI restriction enzyme (Amersham Pharmacia Biotech), as previously described. For comparison purposes, the first OXA-23-producing *A. baumannii* clone isolated in Brazil was also included.[3] Analysis of PFGE patterns was performed by the BioNumerics software (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA). The banding patterns obtained were compared by the unweighted pair-group method with arithmetic

averages, using the Dice similarity coefficient. Banding patterns with a similarity coefficient above 80% were considered as belonging to the same cluster.

Hybridization of plasmid and genomic DNA. Plasmid and genomic DNA was extracted from one representative of each cluster identified, using the Kieser method and QIAmp DNA mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), respectively.[10] Hybridization of plasmid and genomic DNA was performed after Southern transfer onto a Hybond N+ nylon membrane (GE Healthcare, UK). Labeling of bla_{OXA-23} specific probe and signal detection were carried out using a nonradioactive labeling and detection kit according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare, UK). The hybridization of genomic DNA was also attempted by using the endonuclease I-CeuI technique, as described previously.[11]

RESULTS

Eight-three out of 91 (91.2%) isolates were resistant to carbapenems. The majority of isolates were recovered from respiratory tract (n = 64), followed by bloodstream (n = 22), intra-abdominal (n = 3) and urinary tract infections (n = 2).

Most *A. baumannii* isolates were susceptible to polymyxin (MIC_{90}, 1 mg/L; 97.8% susceptible), except for two isolates recovered in the cities of São Paulo and São Luís (MIC, > 4 mg/L), respectively. Overall, the susceptibility rates to the other antimicrobials tested were low. Amikacin was the second most active antimicrobial against isolates studied ($MIC_{90,}$ > 32 mg/L; 18.7% susceptible), followed by ceftazidime and cefepime ($MIC_{90,}$ > 16 mg/L; 12.1% and 8.8% susceptible, respectively), imipenem and meropenem ($MIC_{90,}$ > 8 mg/L; 6.6%

susceptible), piperacillin/tazobactam (MIC_{90} > 64/4mg/L; 3.3% susceptible), ciprofloxacin (MIC_{90} , > 2 mg/L; 3.3% susceptible), and levofloxacin ($MIC_{90,}$ > 4mg/L; 3.3% susceptible).

The bla_{OXA-23} gene was present in 76 (83.5%) isolates of the whole collection, being more frequently identified in *A. baumannii* collected from Belo Horizonte, Blumenau, Curitiba and São Luís (100% of isolates from each city), followed by Rio de Janeiro (93.7%), Porto Alegre (80.0%), and São Paulo (69.0%). The bla_{OXA-23} gene was not detected among *A. baumannii* isolates recovered from Salvador city. The crude extracts of OXA-23 producers showed weak carbapenemase activity whereas no imipenem hydrolysis was observed for non-OXA-23-producing isolates (n=15). As expected, all *A. baumannii* isolates studied presented the bla_{OXA-51} gene.

The IS*Aba1* element was positioned upstream bla_{OXA-23} in all isolates, whereas no insertion sequence was observed upstream bla_{OXA-51}. No isolate showed amplification of bla_{OXA-24}, bla_{OXA-58} or metallo-beta-lactamase-encoding genes.

All OXA-23-producing isolates were fully resistant to carbapenems, fluoroquinolones and piperacillin/tazobactam, whereas resistance rates for these agents among non-OXA-23-producing isolates were 46.7%, 80.0% and 80.0%, respectively. OXA-23 producers also showed higher resistance rates than non-OXA-23 producers to other antimicrobials, such as amikacin (84.2%/46.7%, $p < 0.001$), ceftazidime (88.1%/73.4%, $p < 0.001$) and cefepime (97.4%/46.7%, $p <$ 0,001).

Nine distinct PFGE clusters were identified among the 76 OXA-23-producing *A. baumannii* isolates (Figure 1A). The predominance of a single clone was observed (cluster A, 36.8%), which was found in six cities (Figure 1B). *A. baumannii* belonging to clusters B (17.1%), and D (9.2%) were also identified in more than one city (Figure 1B), while genotypes C, E-I were identified in specific locations (Table 1). Cluster I (5.3%) was exclusively found in the city of São Luís (Table 1).

Hybridization of plasmid DNA extracts using bla_{OXA-23} probe yielded negative results, suggesting that bla_{OXA-23} was chromosomally encoded in the studied isolates. To confirm this hypothesis, hybridization experiments of Southern blotted I-CeuI-digested genomic DNA using specific probes hybridizing bla_{OXA-23} and 16S-rRNA-encoding gene were carried out for representatives of the 9 different PFGE clusters identified. Unfortunately, these experiments were unsuccessful despite of several attempts, resulting in a smear on the hybridization film, jeopardizing the interpretation of results (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we report the spread of multidrug resistant *A. baumannii* isolates producers of OXA-23 among hospitals located in distinct Brazilian regions. OXA-23 producers showed carbapenem resistance rates significantly higher than those of non-OXA-23-producing isolates. However, it has been previously reported that basal expression of OXA-23 is not enough to increase carbapenem MICs above the clinical susceptibility breakpoints.[2] In this manner, our findings probably resulted from the overexpression of bla_{OXA-23} driven by the upstream-located IS*Aba*1-like element. In addition, non-OXA-23-producing *A.*

baumannii showed carbapenem resistance. However, crude extracts of these isolates did not show carbapenemase activity, suggesting the presence of additional mechanisms of resistance to carbapenems such as porin loss, efflux hyperexpression and/or penicillin-binding protein modifications.

Other authors have described the spread of OXA-23-producing *A. baumannii* in Latin-American countries.[12,13] Similarly to our findings, Villegas *et al*. reported the spread of four OXA-23-producing *A. baumannii* genotypes in ten hospitals distributed in six Colombian cities.[12] Furthermore, Merkier *et al*.[13] described the occurrence of three *A. baumannii* genotypes that produced OXA-23 and/or OXA-58 in three Argentinean hospitals. In Brazil, four previous epidemiological surveys, conducted in Curitiba, Rio de Janeiro, São Paulo and Porto Alegre, had reported intra- and inter-hospital dissemination of a small number of OXA-23-producing *A. baumannii* clusters.[3-5,14] In our study, however, we have evidenced that three main OXA-23-producing *A. baumannii* clusters are spread not only among hospitals located in the same city, but also among hospitals distantly located in distinct Brazilian regions. In addition, the most widespread cluster probably had its origin in the city of Curitiba and disseminated through other Brazilian cities.

This circulation of OXA-23-producing *A. baumanni* clones in Brazil emphasizes that strict measures of infection control are urgently needed to reduce both the spread of multi-drug resistant-strains and the number of infections caused by this pathogen at a national level. In addition, OXA-23-producing isolates studied showed increased resistance rates to other antimicrobials that are not hydrolyzed by OXA-23-like enzymes. This fact possibly indicates the presence of additional mechanisms of beta-lactam

resistance. These results are worrisome since they point out to the evolution of antimicrobial resistance among *A. baumannii* clinical isolates, which represents an increasing challenge for antimicrobial therapy of such infections in Brazil.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Fernanda Marques Castrucci, for her assistance and guidance with the BioNumerics software. We are also grateful to Paula Peraro Barbosa and Adriana Giannini Nicoletti, for their excellent technical support.

Funding. The study was carried out as part of our routine work. A.C.G. is a researcher from the National Council for Science and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil (Process number: 307816/2009-5).

Transparency declarations. ACG has received research funding and/or consultation fees from Janssen-Cilag, Pfizer/Wyeth, Novartis, and Sanofi-Aventis. Other authors have nothing to declare.

REFERENCES

1. Andrade S, Sader H, Barth A *et al.* Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacilli isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2003-2008). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2008; **12** Suppl 2: 3-9.

2. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; **54:** 24-38.

3. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA *et al*. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; **41** Suppl 7: 3403-6.

4. Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G *et al.* 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** Suppl 1: 25-8.

5. Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection* 2009; **37** Suppl 5: 474-6.

6. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard - Eighth Edition M07-A8*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.

7. Picão RC, Poirel L, Gales AC *et al.* Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing

bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53** Suppl 9: 3908-13.

8. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J *et al.* Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 2007; **45** Suppl 2: 544-7.

9. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **27** Suppl 4: 351-3.

10. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984; **12**: 19–36.

11. Liu SL, Hessel A, Sanderson KE. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90** Suppl 14: 6874-8.

12. Villegas MV, Kattan JN, Correa A *et al.* Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 2001–4.

13. Merkier AK, Catalano M, Ramírez MS *et al.* Polyclonal spread of bla_{OXA-23} and bla_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *J Infect Dev Ctrie*s 2008; **2** Suppl 3: 235-40.

14. Mostachio AK, van der Heidjen I, Rossi F *et al.* Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-beta-lactamases in

carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol* 2009; **58** Suppl 11: 1522-4.

Table 1. Characteristics and clusters of OXA-23-producing *A. baumannii* isolates collected from 17 Brazilian medical centers.

Cities	Medical centers (n)	Number of isolates	Body site of infection	Number of carbapenem-resistant isolates (%)	bla_{oxa-23} and bla_{oxa-51} -producing isolates	Antimicrobial susceptibility rate (%)[b,c]	Clusters identified
São Paulo	5	29	respiratory tract (18) bloodstream (09) intra-abdominal (02)	26 (89.6)	20	AMK (17.2), POL (96.5) CIP (6.9), LVX (6.9) CAZ (6.9), FEP (17.2) IPM (10.3), MEM (10.3), TZP (6.9)	A, B, C
Rio de Janeiro	4	16	respiratory tract (13) bloodstream (03)	15 (93.7)	15	AMK (3.8), POL (100) CAZ (6.2)	A, B, D, F, G, H
Belo Horizonte	2	10	respiratory tract (06) bloodstream (03) intra-abdominal (01)	10 (100)	10	AMK (40), POL (100) CAZ (20)	A, B, F, H, NT[a]
Porto Alegre	2	15	respiratory tract (09) bloodstream (04) urinary tract (02)	12 (80)	12	AMK (6.7), POL (100) CAZ (13.3), CRO (6.7) FEP (13.3), IPM (13.3), MEM (13.3), TZP (6.7)	A, D, E
Blumenau	1	8	respiratory tract (08)	8 (100)	8	POL (100)	A, B
Curitiba	1	7	respiratory tract (05) bloodstream (02)	7 (100)	7	AMK (57.1), POL (100)	A, D
São Luiz	1	4	respiratory tract (03) bloodstream (01)	4 (100)	4	POL (25), CAZ (75) CRO (25)	I
Salvador	1	2	respiratory tract (02)	1 (50)	0	AMK (50), POL (100) CIP (50), LVX (50), CAZ (50), CRO (50) FEP (50), IPM (50), MEM (50)	—

[a] NT, not typed
[b] All *Acinetobacter baumannii* clinical isolates were resistant to antimicrobials that were not mentioned in the table.
[c] AMK, Amikacin; POL, Polymyxin; CIP, Ciprofloxacin; LVX, Levofloxacin; CAZ, Ceftazidime; CRO, Ceftriaxone; FEP, Cefepime; IPM, Imipenem; MEM, meropenem and TZP Piperacillin/tazobactam.

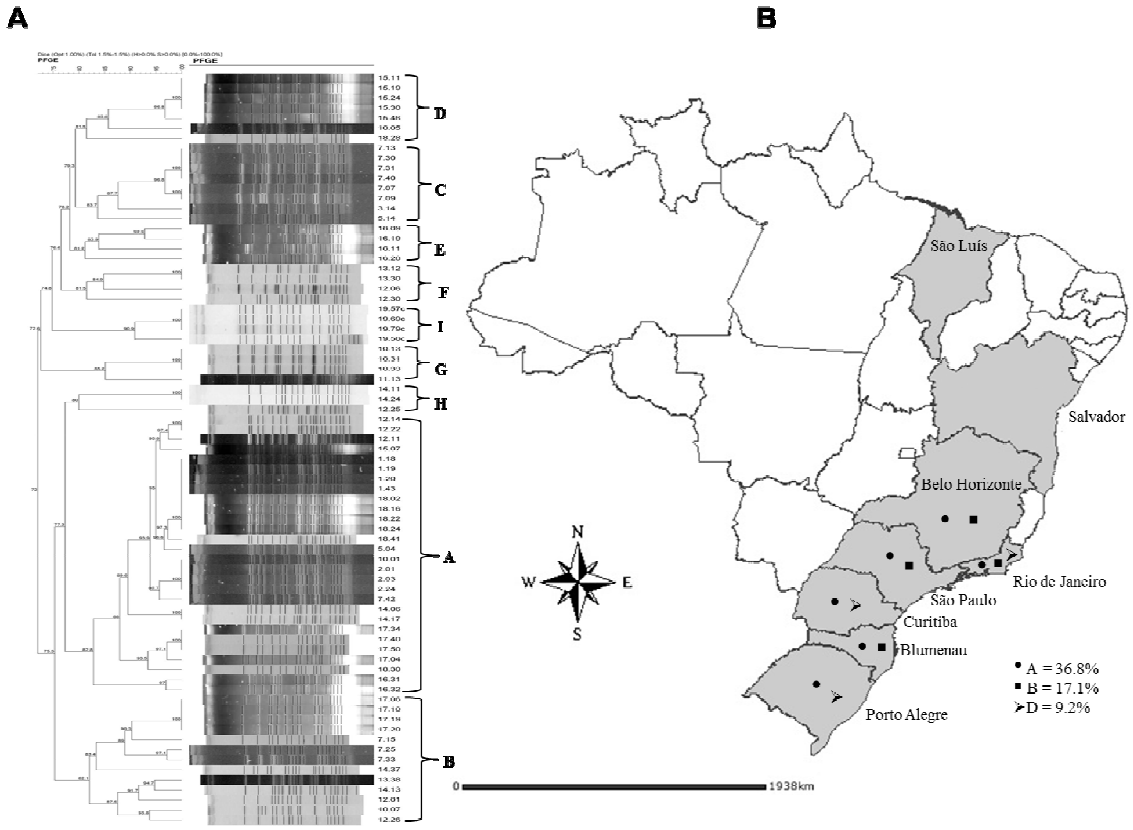

Figure 1. Dendrogram analysis of 76 OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates (A) and geographic distribution of the three main clusters of OXA-23-producing isolates (B).

ARTIGO II

Artigo enviado ao periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, em 27 de setembro de 2010, conforme documento em anexo (Anexo II, página 101).

OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report

Jéssica S. Werneck[1*], Renata C. Picão[1], Cecília G. Carvalhaes[1], Juliana P. Cardoso[1], Ana C. Gales[1]

[1]*Laboratório ALERTA, Disvision of Infectious Diseases, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil;*

Keywords: β-lactam resistance, carbapenemase, OXA-24-like, ampicillin-sulbactam

Running title: Case report of OXA-72-producing *A. baumannii* in Brazil

***Corresponding author.** Mailing address: Laboratório ALERTA, Rua Pedro de Toledo, 781 6º andar, fundos. Vila Clementino, São Paulo-SP. CEP 04039-032. Phone/Fax: 55-11-5576-4748. E-mail: jessica.s.werneck@gmail.com

Dear Editor,

Acinetobacter baumannii is a threatening nosocomial pathogen that has been reported worldwide. Its ability to survive at different pH, temperature and poor nutritional conditions make this pathogen extremely successful. Besides its intrinsic resistance to different antimicrobial agents, *A. baumannii* is capable of accumulating additional mechanisms of resistance, such as, β-lactamase production, altered antibiotic targets, efflux pumps overexpression and porin loss. Carbapenem resistance among *A. baumannii* clinical isolates is frequently associated to the IS*Aba*1-related overexpression of OXA-51, an intrinsic carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase (CHDL) to this species.[1] In addition, the acquisition of other CHDLs has been increasingly reported among carbapenem-resistant *A. baumannii* clinical isolates worldwide. These enzymes are capable of hydrolyzing carbapenems, but not extended-spectrum cephalosporins.[2]

The acquired CHDLs reported in *Acinetobacter* spp. are divided into four subgroups, according to their amino acid sequence identity: OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like and OXA-143-like. To date, only two CHDL clusters were identified among *A. baumannii* clinical isolates in Brazil: OXA-23 and the recently described OXA-143.[3] Here we describe the occurrence of OXA-72, an OXA-24-like enzyme, in an *A. baumannii* clinical isolate from Brazil, increasing the diversity of CHDL clusters reported in this country.

During winter 2007, an elderly patient was submitted to a total hip arthroplasty due to a fracture. Ten days after the surgery, he presented with fever and dyspnea due to a wound infection. Cefepime 2g IV twice daily was

empirically introduced. *A. baumannii* A30235 was isolated in a blood culture. According to the CLSI (M100-S19) recommendations, the isolate A30235 was only susceptible to ampicillin-sulbactam, by disk diffusion. The antimicrobial therapy was modified to ampicillin-sulbactam 3g IV every 6 h. The patient showed clinical resolution and was discharged from the hospital after receiving 14 days of antimicrobial therapy. Unfortunately, the follow-up of this patient was lost.

Susceptibility testing was further performed by CLSI microdilution.[4] The isolate A30235 showed susceptibility to polymyxin B and colistin, reduced susceptibility to ampicillin-sulbactam and resistance to ceftazidime, cefepime, ceftriaxone, imipenem, meropenem, ciprofloxacin and amikacin (Table 1).

A multiplex PCR assay targeting CHDLs-encoding genes was performed using previously published primers and cycling conditions.[5] The presence of $bla_{\text{OXA-51-like}}$ and $bla_{\text{OXA-24/40}}$ was confirmed by PCR. DNA sequencing identified the $bla_{\text{OXA-24/40}}$ amplicon as $bla_{\text{OXA-72}}$. A subsequent PCR reaction targeting both $bla_{\text{OXA-72}}$ and the insertion sequence IS*Aba*1 yielded negative result, indicating that $bla_{\text{OXA-72}}$ expression was not driven by the promoter present in this IS element. Amplification of metallo-beta-lactamase-encoding genes was not detected.

Plasmid extract obtained by the Kieser method[6] was used to transform electrocompetent *A. baumannii* ATCC 19606, as previously described.[3] Selection of transformants was performed in Luria-Bertani agar supplemented with ticarcillin 100 mg/L and the presence of $bla_{\text{OXA-72}}$ was confirmed by PCR. Electrophoresis of plasmids extracted from a transformant and subsequent

Southern blot and hybridization with *bla*$_{OXA-72}$ specific probe showed that the *bla*$_{OXA-72}$ gene was located on a plasmid of about 86 kb. Susceptibility testing of transformants revealed increased meropenem and imipenem MICs, whereas cephalosporin MICs were identical to those of *A. baumannii* ATCC 19606 as expected (Table 1).

Studies with ampicillin-sulbactam have demonstrated the efficacy of this association as an alternative treatment of infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp.[7] According to the CLSI criteria, the strain A30235 was classified as susceptible and intermediate to ampicillin-sulbactam by disk diffusion and broth microdilution, respectively. Since minor errors have been observed for this combination by disk diffusion, the ampicillin-sulbactam MIC determination is required when this compound is prescribed for treatment of serious infections such as sepsis. Despite of being infected by an isolate that showed reduced susceptible to ampicillin-sulbactam, the patient had a good clinical outcome after treatment.[8]

The OXA-72 enzyme was first identified *in A. baumannii* from Thailand, in 2004 (accession no. AY739646). Later on, this enzyme was reported in *Acinetobacter* spp. clinical isolates from China, South Korea, Taiwan, Italy, Spain and France.[2, 9-11] In this study, we identified a plasmid-encoded OXA-72 in *A. baumannii* clinical isolate from Brazil. The isolate A30235 also showed increased resistance rates to extended-spectrum cephalosporins that are not hydrolyzed by OXA-72, suggesting the presence of additional mechanism of β-lactam resistance.

The occurrence of *bla*$_{OXA-72}$ located in a mobile genetic element points out the increasing diversity of CHDLs among *Acinetobacter* spp. clinical isolates in Brazil and its potential of spread. Consequently, it is essential that Brazilian Infection Control Committee members are aware of OXA-72 emergence. In this manner, appropriate control measures could be taken to avoid its dissemination among Brazilian hospitals, which have experienced the OXA-23-producing *A. baumannii* spread.[12]

Funding. The study was carried out as part of our routine work. A.C.G. is a researcher from the National Council for Science and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil (Process number: 307816/2009-5).

Transparency declarations. ACG has received research funding and/or consultation fees from Janssen-Cilag, Wyeth/Pfizer, Novartis, and Sanofi-Aventis. Other authors have nothing to declare.

References

1. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M *et al*. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2010; **65** Suppl 2: 233-8.

2. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; **54**: 24-38.

3. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M *et al.* OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2009; **53**: 5035-8.

4. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard - Eighth Edition M07-A8*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.

5. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; **27** Suppl 4: 351-3.

6. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*. 1984; **12**: 19-36.

7. Oliveira MS, Prado GV, Costa SF *et al*. Ampicillin/sulbactam compared with polymyxins for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother*. 2008; **61** Suppl 6: 1369-75.

8. Swenson JM, Killgore GE, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter* spp., by NCCLS broth microdilution and disk diffusion methods. *J Clin Microbiol*. 2004; **42** Suppl 11: 5102-8.

9. Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M *et al.* Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03254.x.

10. Candel FJ, Calvo N, Head J *et al.* A combination of tigecycline, colistin, and meropenem against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in a renal transplant recipient: pharmacodynamic and microbiological aspects. *Rev. Esp. Quimioter*. 2010; **23** Suppl 2: 103-8.

11. Barnaud G, Zihoune N, Ricard JD *et al.* Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France. *J Hosp Infect* 2010. Doi:10.1016/j.jhin.2010.05.026.

12. Werneck JS, Picão RC, Marguti V *et al*. Genetic Relationship of OXA-23-Producing *Acinetobacter* spp. Isolated from Distinct Brazilian Regions. In: *Abstracts of the Fiftieth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Boston, MA, 2010*. Abstract C2-104. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

Table 1. Antimicrobial susceptibility profile of *A. baumannii* A30235 clinical isolate, the recipient strain *A. baumannii* ATCC 19606, and the transconjugant *A. baumannii* ATCC 19606 carrying bla_{OXA-72}.

Antimicrobials	MIC (mg/L)		
	A. baumannii A30235	*A. baumannii* ATCC 19606 carrying bla_{OXA-72}	*A. baumannii* ATCC 19606
Polymyxin B	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Colistin	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Ampicillin/sulbactam	16/8	ND	ND
Piperacillin/tazobactam	>64/4	8/4	4/4
Ceftazidime	>16	2	2
Cefepime	>16	1	1
Ceftriaxone	>32	8	8
Imipenem	>32	32	0.5
Meropenem	>32	32	0.5
Ciprofloxacin	>4	0.5	0.5
Amikacin	>32	8	8

ND, not determined.

DISCUSSÃO

Acinetobacter spp. é um patógeno oportunista e desafiador devido à sua capacidade de sobrevivência em condições adversas. As espécies de *Acinetobacter* encontram-se amplamente distribuídas no ambiente hospitalar e podem ser disseminadas entre os pacientes principalmente pelas mãos contaminadas dos profissionais da saúde, em soluções aquosas, e detergentes [Chan *et al.*, 2007; Lecocq *et al.*, 1975; Wisplinghoff *et al.*, 2007]. Infecções nosocomiais causadas por *A. baumannii* envolvem na sua maioria, o trato respiratório e a corrente sanguínea de pacientes infectados [Peleg *et al.*, 2008; Dijkshoorn *et al.*, 2007; Dalla-Costa *et al.,* 2003; Merkier *et al.,* 2008; Martins *et al.,* 2009; Carvalho *et al.,* 2009; Mostachio *et al.*, 2009; Schimith Bier *et al.*, 2010]. Apesar de sua baixa virulência, infecções causadas por bactérias deste gênero representam um sério problema terapêutico devido ao surgimento e disseminação de amostras multirresistentes no Brasil e no mundo. Segundo Sader e colaboradores (1998), isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos surgiram na América Latina no final da década de 90. Desde então, vem sendo registrado o aumento gradativo das taxas de resistência a estes antimicrobianos [Lewis *et al.,* 2000; Tognim *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2008].

Nesta dissertação são apresentados dois estudos envolvendo isolados clínicos de *A. baumannii* que apresentaram mecanismos enzimáticos de resistência aos carbapenêmicos, a produção de carbapenemases do tipo OXA. A realização deste projeto nos possibilitou escrever dois artigos, que foram submetidos ao periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

O primeiro artigo descreve um estudo conduzido para avaliar a relação genética de amostras de *A. baumannii* multirresistentes produtoras de OXA-23-like, provenientes de distintas cidades brasileiras. Neste estudo, foram avaliadas 91 amostras clínicas de *A. baumannii* isoladas nas cidades de São Paulo/SP (n = 29), Rio de Janeiro/RJ (n = 16), Belo Horizonte/MG (n = 10), Porto Alegre/RS (n = 15), Blumenau/SC (n = 8), Curitiba/PR (n = 7), São Luiz/MA (n = 4) e Salvador/BA (n=2). Nesta coleção, observamos uma alta taxa de resistência aos carbapenêmicos (91,2%) e a pesquisa de genes codificadores de carbapenemases do tipo OXA revelou a presença de $bla_{\text{OXA-23-like}}$ em 83,5% dos isolados estudados (Anexo III, página 102).

As enzimas OXA-23-like pertencem ao subgrupo das carbapenemases do tipo OXA adquiridas em *Acinetobacter* spp. Embora estas β-lactamases confiram baixos níveis de resistência aos carbapenêmicos, a presença do elemento de inserção IS*Aba1* à montante do gene $bla_{\text{OXA-23-like}}$ pode levar a uma hiperexpressão deste último, tornando o isolado altamente resistente aos carbapenêmicos [Segal *et al.*, 2007]. No presente estudo, todos os isolados produtores de enzimas da família OXA-23 apresentaram o elemento de inserção IS*Aba1* à montante do $bla_{\text{OXA-23}}$, fornecendo assim, a sequência promotora necessária para a hiperexpressão deste gene e conferindo o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos. A presença do elemento de insersão IS*Aba1* à montante de $bla_{\text{OXA-23}}$ também foi observada em outros estudos, como na Argentina e na Colômbia [Merkier *et al.*, 2008, Villegas *et al.*, 2007a]. No Brasil, o elemento IS*Aba1* foi observado em um único estudo, no qual os autores descrevem a padronização uma nova metodologia para detecção rápida de genes codificadores de carbapenemase. Embora o elemento IS*Aba1* tenha sido

identificado, os autores não deixaram claro sua localização em relação ao gene *bla*$_{OXA-23}$ [Mostachio *et al.*, 2009].

Alguns dos isolados resistentes aos carbapenêmicos não apresentaram a amplificação de genes codificadores de carbapenemases pesquisados e, além disso, a atividade hidrolítica sobre os carbapenêmicos não foi observada pelo extrato bruto celular, sugerindo que outros mecanismos possam estar envolvidos, possivelmente a hiperexpressão de bombas de efluxo, modificação nas proteínas ligadoras de penicilina (PBP's) e/ou perda de porinas. Nos estudos epidemiológicos realizados na Argentina e Colômbia, também foram observados, embora em menor quantidade, isolados resistentes aos carbapenêmicos, nos quais não foram observados a produção de carbapenemases, sugerindo o envolvimento de outros mecanismos de resistência [Merkier *et al.*, 2008, Villegas *et al.*, 2007a].

Também pudemos observar que os isolados de *A. baumannii* produtores da OXA-23 apresentaram um aumento da taxa de resistência a outros antimicrobianos (Anexo IV, página 106), que não estão incluídos no espectro hidrolítico desta enzima, indicando que possivelmente tenha ocorrido a disseminação concomitante de outros determinantes de resistência. Isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23 e resistentes a agentes antimicrobianos de outras classes, como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, também foram descritos nos estudos epidemiológicos conduzidos nas cidades de Porto Alegre e Curitiba [Martins *et al.*, 2009; Dalla-Costa *et al,* 2003; Schimith Bier *et al.*, 2010]. Estes resultados são preocupantes, uma vez que isto ressalta a evolução

da resistência aos antimicrobianos entre isolados clínicos de *A. baumannii* no Brasil.

Nossos resultados de tipagem molecular identificaram a presença de nove grupos de genótipos de *A. baumannii* produtores de OXA-23 (Anexo V, página 107), três dos quais circularam em seis das cidades brasileiras estudadas. O genótipo predominante, "A", apresentou o mesmo perfil de restrição do clone identificado na cidade de Curitiba em 2003, naquele que foi o primeiro estudo a descrever a disseminação de *A. baumannii* produtores de OXA-23 no Brasil [Dalla-Costa *et al.*, 2003]. Schimith Bier e colaboradores (2010) realizaram um estudo posterior no qual foi observada a permanência em Curitiba, de 1999 até abril de 2004, deste mesmo genótipo de *A. baumannii* produtor de OXA-23. Com os resultados do nosso estudo, pudemos verificar que este clone ainda se encontra predominante na cidade de Curitiba. Em contraste, na cidade de São Luís foi encontrada a predominância de um único genótipo de *A. baumannii*. Entretanto, este resultado pode estar relacionado ao número restrito de amostras provenientes desta cidade.

A análise da localização gênica nos nove grupos de genótipos estudados, sugeriu que o gene $bla_{\text{OXA-23}}$ estava localizado no cromossomo destes representantes. Apesar de exaustivas repetições de diferentes metodologias, nossos resultados não foram conclusivos para a confirmação exata da localização. Entretando, Villegas e colaboradores, avaliaram também a localização gênica nos quatro principais clones estudados, sendo que três clones obtiveram a localização do gene $bla_{\text{OXA-23}}$ em cromossomo e um clone,

obteve a localização do gene *bla*$_{OXA-23}$ em plasmídio, não demonstrando uma discrepância em nossos resultados [Villegas *et al.*, 2007a].

Embora existam estudos brasileiros prévios relatando a disseminação de clones produtores de OXA-23 localmente, nenhum estudo brasileiro fez a análise comparativa dos genótipos das amostras de *A. baumannii* produtoras de OXA-23 isoladas em distintas cidades brasileiras. Além disso, também não foi avaliado nestes estudos a localização do gene *bla*$_{OXA-23,}$ e nem a presença do elemento IS*Aba1* à montante do gene *bla*$_{OXA-23,}$ que poderia resultar no alto grau de resistência aos carbapenêmicos observado. Desta maneira, esclarecer estes pontos foram os objetivos deste trabalho.

O segundo artigo trata de um relato de caso de um paciente que apresentou uma infecção por *A. baumannii* produtor de OXA-72, uma carbapenemase da família OXA-24.

A. baumannii produtores de OXA-24 são prevalentes na Península Ibérica e também foram identificados em várias cidades dos Estados Unidos, o gene *bla*$_{OXA-24-like}$ pode estar localizado tanto no plasmídio quanto no cromossomo [Lopes *et al.*, 2002; Lolans *et al.*, 2006]. Após seu surgimento em 2000, variantes deste subgrupo foram descritas. Uma destas variantes é a enzima OXA-72, que foi primeiramente descrita em 2004, em uma amostra de *A. baumannii* isolada na Tailândia [GenBank accession no. AY739646] e, posteriormente, esta enzima também foi identificada em isolados de *A. baumannii* recuperados na China, na Coréia do Sul, em Taiwan, na Itália, na Espanha e, recentemente, na França [Wang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Lu *et al.,* 2009; Di Popolo *et al.,*2010 - *in press*; Candel *et al.*, 2010; Barnaud *et al.*, 2010 - *in press*].

Neste estudo identificamos o gene *bla*$_{OXA-72}$ em um isolado de *A. baumannii* recuperado de um paciente internado em um hospital da cidade de São Paulo. O isolado em questão, A 30235, apresentou resistência aos aminoglicosídeos, às cefalosporinas, aos carbapenêmicos, à ciprofloxacina e à ticarcilina/acido clavulânico, com exceção à ampicilina-sulbactam. A técnica de transformação foi bem sucedida e permitiu observarmos a transferência do gene *bla*$_{OXA-72}$ para uma cepa de *A. baumannii* receptora, evidenciando a localização plasmidial deste determinante de resistência.

Assim como era esperado, o transformante contendo o gene *bla*$_{OXA-72}$ obtido em nosso estudo, apresentou Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de imipenem e meropenem mais elevadas do que aqueles obtidos para a bactéria receptora, o que é resultado da expressão da carbapenemase OXA-72. Adicionalmente, não observamos neste transformante o aumento das CIMs para as cefalosporinas de amplo espectro em relação à cepa receptora, visto que as carbapenemases do tipo OXA não hidrolizam significativamente estes antimicrobianos [Poirel *et al.*, 2010]. Assim, a resistência à cefepime, à ceftriaxona e à ceftazidima apresentadas pelo isolado A 30235, provavelmente se deve à presença de outros determinantes de resistência, não codificados pelo mesmo plasmídio que carrega o gene *bla*$_{OXA-72}$. Achados semelhantes foram descritos no artigo de caracterização da carbapenemase OXA-143, a qual também foi isolada de uma amostra brasileira de *A. baumannii* [Higgins *et al.*, 2009]. Os mecanismos relacionados com a resistência às cefalosporinas de amplo espectro apresentada pelo isolado clínico A30235 ainda estão sob investigação.

Apesar de existirem descrições da enzima OXA-72 em vários países, a maioria destes estudos não traz informações acerca da localização do gene *bla*$_{OXA-72}$, exceto pelo trabalho realizado por Lu e colaboradores (2009). Estes pesquisadores conduziram um estudo epidemiológico em um hospital de Taiwan e observaram que isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-72 apresentavam o gene correspondente, *bla*$_{OXA-72}$, carreado por um plasmídio de aproximadamente 54kb. Diferente dado foi apresentado em nosso estudo, em que o plasmídeo contendo *bla*$_{OXA-72}$ adquirido pelo transformante, apresentou peso molecular de ~ 86 kb (Anexo VI, página 108).

No Brasil, a associação ampilicina/sulbactam começou a ser utilizada em 1996. Vários estudos demonstraram a eficácia desta combinação para tratamento de infecções por *Acinetobacter* spp. [Levin *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2008; Jellison *et al.*, 2001]. Embora tenhamos observado uma diferença de resultados no perfil de sensibilidade do isolado A30235, em que o isolado apresentava ao teste de disco difusão, sensibilidade à ampicilina/sulbactam e, ao o teste de microdiluição em caldo, redução desta sensibilidade; o paciente apresentou resolução da infecção quando tratado com esta associação. Isto indica a necessidade da determinação da CIM à ampicilina/sulbactam quando este composto for selecionado como terapia. O sucesso terapêutico em nosso estudo pode ser atribuído às elevadas dosagens deste antimicrobiano que o paciente recebeu durante a terapia antimicrobiana.

Oliveira e colaboradores demonstraram que ampilicina/sulbactam pode causar falência renal em pacientes, semelhante ao que ocorre quando são tratados com polimixina [Oliveira *et al.,* 2008]. Apesar de o paciente ser idoso,

não foi constatada qualquer alteração renal durante e após o tratamento com ampilicina/sulbactam.

CONCLUSÕES

- Os isolados de *A. baumannii* estudados apresentaram altas taxas de resistência aos β-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, sendo que somente a polimixina apresentou atividade contra a maioria dos isolados estudados.

- A grande maioria dos isolados estudados apresentou o gene bla_{OXA-23} (83,5%), enquanto genes codificadores de metalo-β-lactamases não foram identificados neste estudo.

- Todos os isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23 apresentaram o elemento de inserção IS*Aba1* à montante do gene bla_{OXA-23}, sugerindo que a resistência aos carbapenêmicos observada nestes isolados pode ser resultante da hiperexpressão de bla_{OXA-23}.

- Foram observados nove grupos de genótipos entre os isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23.

- Três principais grupos de *A. baumannii* produtores de OXA-23 foram observados circulando em seis cidades das regiões sudeste e sul do Brasil, sendo que o genótipo predominante, “A”, apresentou relação clonal àquele primeiramente descrito na cidade de Curitiba, em 2003. Este fato evidência o sucesso na permanência e na disseminação deste clone entre hospitais localizados em distintas cidades brasileiras. Em contrapartida, foi encontrado um único genótipo de *A. baumannii* produtor de OXA-23 na cidade de São Luís, que demostrou ser exclusivo desta localidade.

- Nossos achados indicaram a provável localização cromossomal do gene *bla*$_{OXA-23}$ nos isolados clínicos de *A. baumannii* produtores de OXA-23 estudados.

- Foi identificado, pela primeira vez no Brasil, um isolado clínico de *A. baumannii* produtor de OXA-72, cujo gene correspondente, *bla*$_{OXA-72}$, apresentava localização plasmidial.

- O isolado produtor de OXA-72 demonstrou resistência a outros antimicrobianos que não estão incluídos no espectro hidrolítico desta enzima, sugerindo a presença de outros determinantes de resistência bacteriana na amostra estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN *et al.*Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J. Clin. Microbiol*. 2009; **47**: 2670-1.

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

Andrade SS, Sader H, Barth A *et al.*Antimicrobial Susceptiblility of Gram-Negative Bacilli Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program (2003-2008). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2008; **12** (2): 3-9.

In press. Barnaud G, Zihoune N, Ricard JD *et al.* Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France. *J Hosp Infect*. 2010. Doi:10.1016/j.jhin.2010.05.026.

Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R *et al.* Characterization of beta-lactamase gene bla_{PER-2}, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1996; **40:** 616–20.

Bergogne-Bérézin E & Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev.* 1996; **9**(2):148-65.

Berlau J, Aucken H, Malnick H *et al.* Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999; **18**: 179–83.

Bonnet R, Marchandin H, Chanal C *et al*. Chromosome-encoded class D beta-lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; **46** (6): 2004-6.

Bonomo RA & Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis*. 2006; **43**(2): 49-56.

Bou G & Martínez-Beltrán J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother*. 2000a ; **44**(2):428-32.

Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran A. OXA-24, a novel class D-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000b **44**:1556–61.

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**: 11–5.

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

Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. Antimicrob.Agents Chemother. 1989b; **33:** 271-6.

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, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; **54**(3): 969-76.

Candel FJ, Calvo N, Head J *et al.* A combination of tigecycline, colistin, and meropenem against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in a renal transplant recipient: pharmacodynamic and microbiological aspects. *Rev. Esp. Quimioter*. 2010; **23**(2):103-8.

Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G *et al.* 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.

Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M *et al.* Spread of $bla_{CTX-M-type}$ and bla_{PER-2} beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2006; **57**(5):975-8.

Chan PC, Huang LM, Lin HC *et al.* Control of an outbreak of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in a neonatal intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2007; **28**(4):423-9.
Chen T-L, Siu L-K, Lee Y-T *et al. Acinetobacter baylyi* as a pathogen for opportunistic infection. *J. Clin. Microbiol*. 2008; **46**:2938–44.

Choury D,. Szajnert M-F,. Joly-Guillou M-L *et al.* Nucleotide sequence of the bla_{RTG-2} (CARB-5) gene and phylogeny of a new group of carbenicillinases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000. **44**:1070– 4.

Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET *et al.* IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; **45**(3):710-4.

Corbella X, Pujol M, Ayats J *et al*. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*. 1996; **23**: 329–34.

Corvec S, Caroff N, Espaze E *et al.* AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J. Antimicrob. Chemother*. 2003; **52**: 629–35.

Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T *et al.* Overexpression of Resistance-Nodulation-Cell Division Pump AdeFGH confers Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; **54**: 4389-93.

Cuenca FF, Pascual A, Martinez Marinez L *et al.* Evaluation of SDS-polyacrylamide gel systems for the study of outer membrane protein profiles of clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *J. Basic Microbiol.* 2003; **43**: 194–201.

Da Silva GJ, Correia M, Vital C *et al.* Molecular characterization of bla_{IMP-5}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; **215**(1): 33-9.

Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**(7): 3403-6.

Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S *et al.* AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; **52**(2): 557-62.

Devaud M, Kayser FH, Bachi B. Transposon mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982; **22**: 323–9.

In press. Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M *et al.* Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin. Microbiol. Infect*. 2010. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03254.x.

Dijkshoorn L, van Aken E, Shunburne L *et al.* Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin Microbio. Infect*. 2005; **11:**329–32.

Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol.* 2007; **5**: 939–51

Donald HM, Scaife W, Amyes SG *et al.* Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; **44**: 196–9.

Dupont M, Pages JM, Lafitte D *et al.* Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Proteome Research*. 2005; **4**(6): 2386-90.

Endimiani A, Luzzaro F, Migliavacca R *et al.* Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; **51**(6): 2211-4.

Falagas ME & Bliziotis IA. Pandrug-resistant gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2007; **29**: 630–6.

Figueiredo S, Poirel L, Papa A *et al.* First identification of VIM-4 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2008; **14**(3): 289-90.

Figueiredo S, Poirel L, Croizé J *et al.* In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to IS*Aba1*-mediated overexpression of the natural bla_{OXA-66} oxacillinase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009a ; **53**: 2657- 9.

Figueiredo S, Poirel L, Papa A *et al.* Overexpression of the naturally occurring bla_{OXA-51} gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence IS*Aba9*. Antimicrob. Agents Chemother. 2009b ; **52** : 4045-7.

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

Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM *et al*. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol.* 2000; **49**(10): 929-36.

Getchell-White SI, Donowitz LG, Groschel DH. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect. Control and Hosp. Epidemiol*. 1989; **10**:402-7.

Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Tsakris A *et al*. IBC-1, a novel integron-associated class A β-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000 ; **44**: 2247–53.

Giordano A, Varesi P, Bertini A *et al.* Outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in Rome, Italy. *Microb. Drug Resist*. 2007 ; **13:** 37–43.

Gribun A, Nitzan Y, Pechatnikov I *et al.* Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr. Microbiol*. 2003 ; **47**: 434–43.

Heritier C, Poirel L, Fournier P-E *et al*. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005a ; **49**: 4174- 9.

Heritier C, Poirel L, Lambert T *et al.* Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005b ; **49**: 3198–3202.

Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase overexpression resulting from insertion of IS*Aba1* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect*. 2006 ; **12**: 123–130.

Higgins PG, Poirel L, Lehmann M *et al*. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2009 ; **53**: 5035–8.

Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M *et al.* Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2010; **65**(2): 233-8. Erratum in: J Antimicrob Chemother. 2010; **65**(6):1317.

Houang ET, Chu YW, Leung CM *et al*. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 228–34.

Houang ET, Chu YW, Lo WS *et al.* Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-beta-lactamase (bla_{MP-4}) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; **47**(4):1382-90.

Huang ZM, Mao PH, Chen Y *et al.* Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2004 ; **25**: 425–427.

Huang LY, Chen TL, Lu PL *et al.* Dissemination of multidrug-resistant, class 1 integron-carrying *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. *Clin Microbiol Infect.* 2008; **14**(11): 1010-9.

Huang LY, Lu PL, Chen TL *et al.* Molecular characterization of beta-lactamase genes and their genetic structures in *Acinetobacter* genospecies 3 isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; **54**(6): 2699-703.

Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM *et al.* Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; **49**(7): 2941-8.

Hwa WE, Subramaniam G, Navaratnam P. Detection and characterization of class 1 integrons among carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter* spp. in Malaysia. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009; **42**(1): 54-62.

Ikonomidis A, Ntokou E, Maniatis AN *et al.* VIM-1 metallo-beta-lactamase phenotypes among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2008; **46**(1): 346-9.

Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin.Microbiol.Rev*. 2009; **22**:161-82.

Jawad A, Seifert H, Snelling AM *et al.* Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J. Clin. Microbiol*.1998; **36**(7): 1938-41.

Jellison TK,. Mckinnon PS, Rybak MJ. Epidemiology, resistance, and outcomes of *Acinetobacter baumannii* bacteremia treated with imipenem-cilastatin or ampicillin-sulbactam. *Pharmacotherapy*. 2001; **21**(2):142-8.

Joly-Guillo ML, Vallée E, Bergogne-Bérézin E *et al*. Distribution of beta-lactamases and phenotype analysis in clinical strains of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother*. 1988; **22**(5): 597-604.

Juan Nicolau C, Oliver A. Carbapenemases in Pseudomonas spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; **28** (1): 19-28.

Karageorgopoulos DE, Falagas ME.Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis*. 2008; **8**(12): 751-62.

Knothe H, Shah P, Krcmery V *et al.* Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983; **11**(6): 315-7.

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

Lecocq E, Linz R. A hospital epidemic due to *Achromobacter calcoaceticus*. *Pathol Biol (Paris)*. 1975; **23**(4): 277-82.

Lee K, Lee WG, Uh Y *et al.* VIM- and IMP-type metallo-b-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis*. 2003; **9**: 868–71.

Lee K, Yum JH, Yong D *et al.* Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; **49**(11): 4485-91.

Lee K, Kim MN, Choi TY *et al.* Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009; **33**(6): 520-4.

Lee K, Kim CK, Hong SG *et al.* Characteristics of clinical isolates of *Acinetobacter* genomospecies 10 carrying two different metallo-beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; **36**(3): 259-63.

Lee YT, Turton JF, Chen TL *et al.* First identification of $bla_{OXA-51-like}$ in non-baumannii *Acinetobacter* spp. *J Chemother.* 2009; **21**(5):514-20.

Levin AS, Mendes CMF, Sinto SI *et al*. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in São Paulo, Brazil. *Infection Control and Hospital Epidemiology.* 1996; **17**: 366 -8.

Levin AS, Levy CE, Manrique AE *et al.* Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2003 ; **21**: 58–62.

Lewis MT, Gales AC, Sader HS *et al.* Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from latin american patients with a diagnosis of pneumonia: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000; **37**(1): 63-74.

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**(12): 4476-8.

Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; **8**:557-84.

Livermore D M, Woodford N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 2006; **14** (9): 413-20.

Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS *et al.* Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006; **50**(9): 2941–5.

Loli A, Tzouvelekis LS, Gianneli D *et al.* Outbreak of *Acinetobacter baumannii* with chromosomally encoded VIM-1 undetectable by imipenem-EDTA synergy tests. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; **52**(5):1894-6.

Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ *et al.* Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *J. Clin. Microbiol*. 2002; **40**: 4741–3.

Lu PL, Huang LY, Lian ST *et al.* How carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. established in a newly constructed hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; **31**(5): 463-6.

Lu PL, Doumith M, Livermore DM *et al.* 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.

Marchaim D, Navon-Venezia S, Leavitt A *et al.* Molecular and epidemiologic study of polyclonal outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in an Israeli hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007; **28**: 945–50.

Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P *et al.* Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; **48**(9): 3298-304.

Marqué S, Poirel L, Héritier C *et al.* Regional occurrence of plasmid mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J. Clin. Microbiol*. 2005; **43**:4885–8.

Martí S, Sánchez-Céspedes J, Oliveira E *et al.* Proteomic analysis of a fraction enriched in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*. *Proteomics*. 2006; **6** (1): S82-7.

Marti S, Sánchez-Céspedes J, Blasco MD *et al.* Characterization of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in an *Acinetobacter* genospecies 3 clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008a; **52**: 2966–2968.

Marti S, Sánchez-Céspedes J, Blasco MD *et al.* Characterization of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in an *Acinetobacter* phenon 6/ct13TU clinical isolate. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2008b; **61**: 468–70.

Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T *et al*. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection*. 2009; **37**(5): 474-6.

Matthew M. Plasmid mediated β-lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *J. Antimicrob. Chemother*. 1979; **5**: 349–358.

Medeiros A A. β-Lactamases. *Br. Med. Bull*. 1984; **40**: 18–27.

Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD *et al.* Codetection of $bla_{OXA-23-like}$ gene $bla_{OXA-133}$ and bla_{OXA-58} in *Acinetobacter radioresistens*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; **53**(2): 843-4.

Merkier AK, Catalano M, Ramírez MS *et al.* Polyclonal spread of bla_{OXA-23} and bla_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *J Infect Dev Ctries*. 2008; **2**(3): 235-40.

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

Moubareck C, Bremont S, Conroy MC *et al.* GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; **53**(8): 3579–81.

Mostachio AK, van der Heidjen I, Rossi F *et al.* Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol.* 2009; **58**(11):1522-4.

Mugnier PD, Poirel L, Naas T *et al.* Worldwide dissemination of the bla_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2010; **16**(1): 35-40.

Murray CK, Hospenthal DR. *Acinetobacter* infection in the ICU. *Crit. Care Clin*. 2008; **24**: 237–248.

Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005. **49**: 1432–40.

Naas T, Coignard B, Carbonne A *et al.* VEB-1 extended-spectrum β-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg. Infect. Dis*. 2006; **12**:1214-22.

Naas T, Namdari F, Réglier-Poupet H *et al.* Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City. *J Antimicrob Chemother*. 2007; **60**(5):1174-6.

Nagano N, Shibata N, Saitou Y *et al.* Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2 type beta-lactamase. *J Clin Microbiol*. 2003; **41**(12):5530-6.

Nagano N, Nagano Y, Cordevant C *et al.* Nosocomial transmission of CTX-M-2 b-lactamaseproducing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J. Clin. Microbiol.* 2004; **42**(9): 3978–84.

Naiemi NA, Duim B, Savelkoul PH *et al.* Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol*. 2005; **43**(9):4862-4.

Navia MM, Ruiz J, Vila J. Characterization of an integron carrying a new class D β-lactamase (OXA-37) in *Acinetobacter baumannii*. *Microb. Drug Resist*. 2002; **8**: 261–5.

Ni M, Zhang D, Qi J. Analysis of AmpC beta-lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Huazhong. Univ Sci. Technolog. Med. Sci*. 2005; **25** (1): 17-9, 23.

Nicolau DP. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother.* 2008; **9**(1): 23-37.

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

Nitzan Y, Pechatnikov I, Bar-El D *et al.* Isolation and characterization of heat-modifiable proteins from the outer membrane of *Porphyromonas asaccharolytica* and *Acinetobacter baumannii*. *Anaerobe.* 1999; **5**(1): 43–50.

Nordmann P & Naas T. Sequence analysis of PER-1 extendedspectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1994; **38**: 104–14.

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

Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis*. 2009; **9**: 228-36.

Oliveira MS, Prado GV, Costa SF *et al.* Ampicillin/sulbactam compared with polymyxins for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother*. 2008; **61**(6):1369-75.

Onarheim H., Hoivik T, Harthug S *et al.* Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Tidsskr. Nor. Laegeforen*. 2000; **120** (9): 1028–1033.

Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; **38**(1):71-8.

Papagiannitsis CC, Loli A, Tzouvelekis LS *et al.* SCO-1, a novel plasmid-mediated class A beta-lactamase with carbenicillinase characteristics from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; **51**(6): 2185-8.

Pasterán F, Rapoport M, Petroni A *et al.* Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; **50**(9): 3222-4.

Paton R, Miles RS, Hood J *et al.* ARI-1: b-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993; **2**(2):81–7.

Peleg AY, Franklin C, Walters L.J *et al.* OXA-58 and IMP-4 carbapenem-hydrolyzing β-lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture isolate from Australia. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006; **50**: 399–400.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*. Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008; **21**(3): 538-82

Perez F, Hujer AM, Hujer KM *et al.* Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; **51**(10):3471-84.

Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β-lactamases. Antimicrob. *Agents Chemother*. 2002; **46**: 1–11.

Pirel L, Marque S, Heritier C *et al.* OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; **49**: 202–208.

Poirel L, Naas T, Guibert M *et al.* Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. **43**: 573-81.

Poirel L, Le Thomas I, Naas T *et al.* Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; **44**:622–32.

Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002; **3**(2): 117-27.

Poirel L, Menuteau O, Agoli N *et al.* Outbreak of extended-spectrum β-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol*. 2003; **41**:3542–7.

Poirel L & Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006; **12**(9): 826-36.

Poirel L, Corvec S, Rapoport M *et al.* 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, Figueiredo S, Cattoir V *et al. Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008a; **52**: 1252–6.

Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008b; 14(1):75-81.
Poirel L, Naas T, Nordmann P. Class D beta-lactamases: Diversity, Epidemiology and Genetics. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2009. doi:10.1128/AAC.01512-08

Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-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**: 77–98.

Potron A, Poirel L, Croizé J *et al.* Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type beta-lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. 2009; **53**(7): 3010-6.

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

Rand KH & Tillan M. Errors in interpretation of Gram stains from positive blood cultures. *Am J Clin Pathol*. 2006; **126**(5):686-90.

Rathinavelu S, Zavros Y, Merchant JL. *Acinetobacter lwoffii* infection and gastritis. *Microbes Infect*. 2003; **5**: 651–7.

Ribera A, Roca I, Ruiz J *et al.* Partial characterization of a transposon containing the *tet*(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother*. 2003; **52**: 477–80.

Riccio ML, Franceschini N, Boschi L *et al.* Characterization of the metallo-β-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; **44**:1229–35.

Robledo IE, Aquino EE, Santé MI *et al.* Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; **54**(3):1354-7.

Roca I, Marti S, Espinal P *et al.* CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; **53**(9): 4013-4.

Rodríguez-Martínez JM, Nordmann P, Ronco E *et al.* Extended-Spectrum Cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2010; **54** (8): 3484-8.

Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J. Antimicrob. Chemother*. 2007; **59**: 1001-4.

Sader HS, Jones RN, Gales AC *et al.* Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from patients in Latin American medical centers with a diagnosis of pneumonia: analysis of results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997). SENTRY Latin America Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998; **32**(4): 289-301.

Saeed S, Fakih MG, Riederer K *et al.* Interinstitutional and intrainstitutional transmission of a strain of *Acinetobacter baumannii* detected by molecular analysis: comparison of pulsed-fi eld gel electrophoresis and repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; **27**: 981–83.

Scaife W, Young HK, Paton RH *et al.* Transferable imipenemresistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J Antimicrob Chemother* 1995; **36**: 585–7.

Schneider I, Queenan AM, Bauernfeind A. Novel carbapenemhydrolyzing oxacillinase OXA-62 from *Pandoraea pnomenusa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; **50**:1330–5.

Seifert H, Baginski R, Schulze A *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; **37:** 750–3.

Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P *et al.* Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal Clinical Microbiology*.1997; **35:** 2819–25.

Segal H, Jacobson RK, Garny S *et al.* Extended -10 promoter in IS*Aba-1* upstream of bla_{OXA-23} from Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; **51**(8): 3040-1.

Sevillano E, Gallego L, García-Lobo JM. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. Pathol. Biol. (Paris). 2009; **57**(6):493-5.

Schimith Bier KE, Luiz SO, Scheffer MC *et al.* Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. *Am J Infect Control.* 2010; **38**(4):308-14.

Simpson IN, Harper PB, O'Callaghan CH. Principal β-lactamases responsible for resistance to β-lactam antibiotics in urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980; **17**: 929–936.

Sirot D, Sirot J, Labia R *et al.* Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 1987; **20**(3):323-34.

Siroy A, Molle V, Lemaitre-Guillier C *et al.* Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005; **49**:4876–83.

Siroy A, Cosette P, Seyer D *et al.* Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *J Proteome Res.* 2006; **5**(12): 3385-98.

Su XZ, Chen J, Mizushima T *et al.* AbeM, an H+-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agentes Chemother*. 2005; **49**(10):4362-4.

Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S *et al*. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis.* 2006; **12**: 981–983.

Tognim MC, Andrade SS, Silbert S *et al.* Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Infect Dis.* 2004; **8**(5): 284-91.

Tognim MC, Gales AC, Penteado AP *et al.* Dissemination of IMP-1 metallo- beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006; **27**(7): 742-7.

Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Hospital outbreak of an imipenem-resistant VIM-2 encoding *Acinetobacter* DNA group 14TU strain in a German teaching hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2004; **10** (3): 48–49.

Tomás MM, Beceiro A, Pérez A *et al.* Cloning and functional analysis of the gene enconding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial *Agents and Chemotherapy*. 2005; **49**(12): 5172-5175.

Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G *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– 2269.

van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T *et al*. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol* 2004; **155**: 105–12.

Van Looveren M, Goossens H, ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2004; **10**(8): 684-704.

Vila J, Marcos A, Marco F *et al. In vitro* antimicrobial production of β-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by

and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; **37**(1): 138–41.

Vila J, Navia M, Ruiz J *et al.* Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; **41**(12): 2757-9.

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

Villegas MV, Kattan JN, Correa A *et al.* Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007a; **51**(6): 2001-4.

Villegas MV, Lolans K, Correa A *et al.* First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007b; **51**: 1553-5.

Villers D, Espaze E, Coste-Burel M *et al*. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Ann Intern Med* 1998; **129**: 182–89.

Wang H, Guo P, Sun H *et al.* Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007; **51**(11):4022-8.

Walsh TR., Toleman MA, Poirel L *et al.* Metallobeta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev*. 2005; **18** (2):306–25.

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

Wisplinghoff H, Schmitt R, Wöhrmann A *et al.* Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Hosp. Infect.* 2007; **66**:174–81.

Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE *et al.* Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; **53**(4):1660-4.

Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2006; **27**(4):351-3.

Yong D, Shin JH, Kim S *et al.* High prevalence of PER-1 extended-spectrum β-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**:1749-51.

Yum JH, Yi K, Lee H *et al.* Molecular characterization of metallo-β-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter genomospecies* 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the bla_{VIM-2} gene cassettes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; **49**(5): 837–40.

Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC *et al.* Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010; **8**(1): 71-93.

Zgurskaya HI, Nikaido H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol*. 2000; **37**(2): 219-25.

ANEXO I*

JAC-2010-1342: Thank you for your manuscript submission

jac@bsac.org.uk <jac@bsac.org.uk> **10 de novembro de 2010 18:56**
Para: jessica.s.werneck@gmail.com, renata.picao@gmail.com

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

10-Nov-2010

Manuscript ID: JAC-2010-1342
Title: Dissemination of OXA-23-producing Acinetobacter baumannii clones in distinct Brazilian cities
Author(s): Werneck, Jéssica; Picão, Renata; Girardello, Raquel; Cayô, Rodrigo; Marguti, Vitor; Dalla-Costa, Libera; Gales, Ana

Dear Mrs Werneck,

We acknowledge receipt of your manuscript. If you should need to contact the Editorial Office please quote the manuscript ID number.

You can track the progress of your manuscript by visiting your Author Centre on the JAC Manuscript Central website (http://mc.manuscriptcentral.com/jac). For an explanation of the JAC editorial process please see the 'Instructions to Authors' (published online at http://www.oxfordjournals.org/jac/for_authors/).

PLEASE NOTE: you MUST provide a submission form, signed by ALL authors, indicating that you have complied with the stipulations in the Instructions to Authors (a suitable submission form is available at http://www.oxfordjournals.org/jac/for_authors/signature.pdf). Authors can sign individual forms, sign in groups or sign the same form, as long as each form includes the full list of authors. This is to conform to good editorial practice and to avoid disputes. The form(s) with the original signatures must be faxed to the JAC Editorial Office as soon as possible.

Yours sincerely

JAC Editorial Office

JAC Editorial Office | Griffin House | 53 Regent Place | Birmingham B1 3NJ | UK

T: +44 (0)121 2621830 | F: +44 (0)121 2129822

Dissemination of OXA-23-producing Acinetobacter baumannii clones in distinct Brazilian cities

Journal:	*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*
Manuscript ID:	JAC-2010-1342
Manuscript Type:	Brief report
Date Submitted by the Author:	10-Nov-2010
Complete List of Authors:	Werneck, Jéssica; Federal University Of São Paulo, Laboratory ALERTA, Division of Infectious Diseases Picão, Renata; Federal University of São Paulo, Laboratory ALERTA, Division of Infectious Diseases Girardello, Raquel; Federal University of São Paulo, Laboratory ALERTA, Division of Infectious Diseases Cayô, Rodrigo; Federal University of São Paulo, Laboratory ALERTA, Division of Infectious Diseases Marguti, Vitor; Federal University of São Paulo, Laboratory ALERTA, Division of Infectious Diseases Dalla-Costa, Libera; Federal University of Parana, Clinical Hospital Gales, Ana; Federal University of São Paulo, Laboratory ALERTA, Division of Infectious Diseases
Keywords:	Acinetobacter baumannii, Molecular epidemiology, Antimicrobial resistance mechanisms

* Carta comprobatória do envio dos artigos I e II ao periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

ANEXO II*

JAC-2010-1162: Thank you for your manuscript submission

jac@bsac.org.uk <jac@bsac.org.uk> **27 de setembro de 2010 13:22**
Para: jessica.s.werneck@gmail.com, renata.picao@gmail.com

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

27-Sep-2010

Manuscript ID: JAC-2010-1162
Title: OXA-72-producing Acinetobacter baumannii in Brazil: a case report
Author(s): Werneck, Jéssica; Picão, Renata; Carvalhaes, Cecilia; Cardoso, Juliana; Gales, Ana

Dear Mrs Werneck,

We acknowledge receipt of your manuscript. If you should need to contact the Editorial Office please quote the manuscript ID number.

You can track the progress of your manuscript by visiting your Author Centre on the JAC Manuscript Central website (http://mc.manuscriptcentral.com/jac). For an explanation of the JAC editorial process please see the 'Instructions to Authors' (published online at http://www.oxfordjournals.org/jac/for_authors/).

PLEASE NOTE: you MUST provide a submission form, signed by ALL authors, indicating that you have complied with the stipulations in the Instructions to Authors (a suitable submission form is available at http://www.oxfordjournals.org/jac/for_authors/signature.pdf). Authors can sign individual forms, sign in groups or sign the same form, as long as each form includes the full list of authors. This is to conform to good editorial practice and to avoid disputes. The form(s) with the original signatures must be faxed to the JAC Editorial Office as soon as possible.

Yours sincerely

JAC Editorial Office

JAC Editorial Office | Griffin House | 53 Regent Place | Birmingham B1 3NJ | UK

T: +44 (0)121 2621830 | F: +44 (0)121 2129822

OXA-72-producing Acinetobacter baumannii in Brazil: a case report

Journal:	*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*
Manuscript ID:	JAC-2010-1162
Manuscript Type:	Correspondence
Date Submitted by the Author:	27-Sep-2010
Complete List of Authors:	Werneck, Jéssica; Federal University of São Paulo, Laboratory ALERTA, Division of Infectious Diseases Picão, Renata; Federal University of São Paulo, Laboratory ALERTA, Division of Infectious Diseases Carvalhaes, Cecilia; Federal University of São Paulo, Laboratory ALERTA, Division of Infectious Diseases Cardoso, Juliana; Federal University of São Paulo, Laboratory ALERTA, Division of Infectious Diseases Gales, Ana; Federal University of São Paulo, Laboratory ALERTA, Division of Infectious Diseases
Keywords:	Acinetobacter baumannii, Antimicrobial resistance surveillance, Beta-lactamase

* Carta comprobatória do envio dos artigos I e II ao periódico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

ANEXO III

Tabela. Perfil de sensibilidade das 91 amostras de *A. baumannii* isoladas de 17 hospitais brasileiros.

Isolado	Carbapenemase produzida	MIC (mg/L)									
		AMC	POL	CIP	LEVO	AXO	CTAZ	FEP	IMI	MERO	PT
1.12	OXA-51	16	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	1	1	>64
1.15	OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
1.18	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
1.19	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
1.20	OXA-23/OXA-51	>32	>4	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
1.43	OXA-23/OXA-51	>32	1	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
2.01	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
2.03	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
2.24	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	16	>8	>8	>64
3.04	OXA-51	<4	<0,5	<0,25	<0,5	16	4	1	0,5	0,25	4
3.09	OXA-51	<4	<0,5	>2	>4	>32	>16	8	>8	>8	>64
3.14	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
3.15	OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	8	>8	>8	>64
3.24	OXA-51	8	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
3.25	OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
3.28	OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	8	>8	>8	>64
3.40	OXA-51	<4	<0,5	<0,25	<0,5	16	4	2	1	1	<1
5.04	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
5.14	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
7.07	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
7.09	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
7.13	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
7.15	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
7.25	OXA-23/OXA-51	>32	1	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
7.30	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
7.31	OXA-23/OXA-51	32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64

Cont. Tabela

Isolado	Carbapenemase produzida	MIC (mg/L)									
		AMC	POL	CIP	LEVO	AXO	CTAZ	FEP	IMI	MERO	PT
7.33	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
7.40	OXA-23/OXA-51	>32	1	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
7.42	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
9.24	OXA-51	<4	2	>2	>4	>32	>16	>16	8	8	>64
10.01	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
10.05	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
10.07	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
10.13	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
10.31	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
10.33	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
11.13	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
12.01	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
12.06	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
12.11	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
12.14	OXA-23/OXA-51	>32	1	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
12.22	OXA-23/OXA-51	>32	1	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
12.25	OXA-23/OXA-51	>32	1	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
12.26	OXA-23/OXA-51	>32	1	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
12.30	OXA-23/OXA-51	32	<0,5	>2	>4	32	4	>16	>8	>8	>64
13.12	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
13.20	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
13.30	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
13.38	OXA-23/OXA-51	16	1	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
14.06	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
14.11	OXA-23/OXA-51	8	<0,5	>2	4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
14.13	OXA-23/OXA-51	8	<0,5	>2	4	32	8	>16	>8	>8	>64
14.17	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
14.24	OXA-23/OXA-51	16	<0,5	>2	>4	>32	8	>16	>8	>8	>64
14.37	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	16	>16	>8	>8	>64
15.07	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	4	>32	>16	>16	>8	>8	>64

Cont. Tabela

Isolado	Carbapenemase produzida	MIC (mg/L)									
		AMC	POL	CIP	LEVO	AXO	CTAZ	FEP	IMI	MERO	PT
15.11	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
15.19	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
15.21	OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	2	8,0	>64
15.24	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
15.30	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
15.46	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
16.09	OXA-23/OXA-51	32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
16.11	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
16.15	OXA-51	<4	<0,5	>2	>4	<0,25	0,5	<0.12	0,5	<0,05	<1
16.19	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
16.28	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
16.31	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	8	8	>8	>8	>64
16.32	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
16.33	OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	16	8	4	>64
17.04	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
17.06	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
17.10	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
17.19	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
17.29	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
17.34	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
17.40	OXA-23/OXA-51	>32	1	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
17.50	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
18.02	OXA-23/OXA-51	<4	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
18.16	OXA-23/OXA-51	8	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
18.22	OXA-23/OXA-51	8	1	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
18.24	OXA-23/OXA-51	8	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
18.28	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
18.30	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
18.41	OXA-23/OXA-51	<4	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64
19.56c	OXA-23/OXA-51	>32	1	>2	>4	>32	16	>16	>8	>8	>64

Cont. Tabela

Isolado	Carbapenemase produzida	MIC (mg/L)									
		AMC	POL	CIP	LEVO	AXO	CTAZ	FEP	IMI	MERO	PT
19.57c	OXA-23/OXA-51	>32	>4	>2	>4	8	8	>16	>8	>8	>64
19.69c	OXA-23/OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	32	8	>16	>8	>8	>64
19.79c	OXA-23/OXA-51	>32	1	>2	>4	16	4	>16	>8	>8	>64
20.15	OXA-51	<4	<0,5	<0,25	<0,5	0,5	2	1	0,25	<0,05	>64
20.21	OXA-51	>32	<0,5	>2	>4	>32	>16	>16	>8	>8	>64

ANEXO IV

Tabela. MIC_{50} e MIC_{90} de antimicrobianos contra os isolados *A. baumannii* produtores de OXA-23/OXA-51 estudados.

ANTIMICROBIANOS	MIC (mg/L)		%S	%R
	MIC_{50}	MIC_{90}		
AMICACINA	>32	>32	11,8	84,2
CEFEPIMA	>16	>16	1,3	97,4
CEFTAZIDIMA	>16	>16	9,2	88,1
CEFTRIAXONA	>32	>32	1,3	93,4
CIPROFLOXACINA	>2	>2	0	100
IMIPENEM	>8	>8	0	100
LEVOFLOXACINA	>4	>4	0	93,4
MEROPENEM	>8	>8	0	100
PIPERACILINA/TAZOBACTAM	>64/4	>64/4	0	100
POLIMIXINA	<0.5	1.0	97,4	2,6

ANEXO V

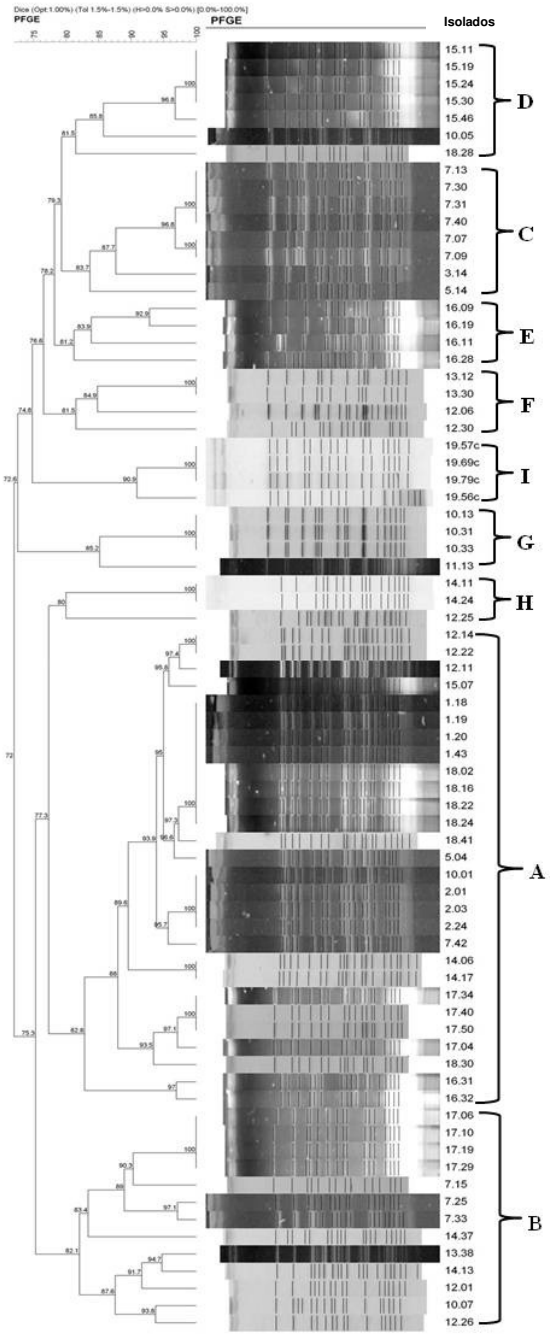

Figura. Árvore filogenética resultante da tipagem, por PFGE, dos 76 isolados de *A.baumannii* produtores de OXA-23 estudados.

ANEXO VI

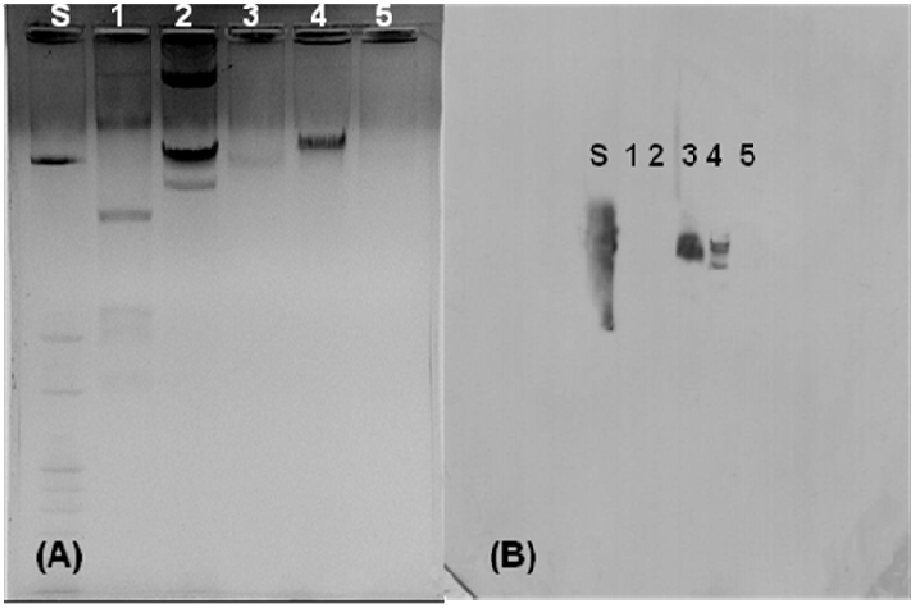

Figura. (A) Gel de eletroforese da extração de DNA plasmidial. (B) Hibridização do DNA presente no gel de eletroforese com sonda marcada específica para o gene bla_{OXA-72}.

S, sonda OXA-72; Linha 1, p50192 controle de plasmídio (peso: 154, 66, 38 e 7Kb); Linha 2, p50193 controle de plasmídio (peso: 11,5; 8,0; 5,9; 3,0; 2,7 e 2,1Kb); Linha 3, *A. baumannii* A30235; Linha 4, *A. baumannii* ATCC 19606 carregando bla_{OXA-72} (transformante); Linha 5, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606.

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