

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

CAMYLLA CARVALHO DE MELO

ASPECTOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES DE ISOLADOS DE *Acinetobacter*
baumannii RELACIONADOS À INFECÇÃO NOSOCOMIAL

RECIFE

2014

CAMYLLA CARVALHO DE MELO

ASPECTOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES DE ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* RELACIONADOS À INFECÇÃO NOSOCOMIAL

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Nilma Cintra Leal

Co-orientadora: Dra. Carina Lucena Mendes-Marques

RECIFE

2014

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

M527a Melo, Camylla Carvalho de.

Aspectos fenotípicos e moleculares de isolados de *Acinetobacter baumannii* relacionados à infecção nosocomial / Camylla Carvalho de Melo. - Recife: [s.n.], 2014.

68 p. : il.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Nilma Cintra Leal.

Co-orientadora: Carina Lucena Mendes-Marques.

1. Infecção hospitalar. 2. *Acinetobacter baumannii*. 3. Carbapenêmicos. 4. Biofilme.

I. Leal, Nilma Cintra. ths. II. Marques, Carina Lucena Mendes. ths. III. Título.

CDU 614.447

Camylla Carvalho de Melo

ASPECTOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES DE ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* RELACIONADOS À INFECÇÃO NOSOCOMIAL

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovado em: 09/05/2014

BANCA EXAMINADORA

Dra. Nilma Cintra Leal

Departamento de Microbiologia/CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti

Departamento de Imunologia/CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Amélia Vieira Maciel

Departamento de Microbiologia/UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente em minha vida, todo o mérito e toda a honra, em todas as pequenas tarefas humanas.

À minha família pela compreensão e apoio. Em especial aos meus pais Inaura e Severino (*in memoriam*) que sempre me ensinaram a importância da educação.

À minha orientadora, Dra. Nilma Cintra Leal pela oportunidade, disposição e aprendizado proporcionados.

À minha co-orientadora, Dra. Carina Lucena Mendes-Marques pelo apoio, paciência e orientações indispensáveis.

Às “minhas meninas” Anne Kelly Santana, Beatriz Toscano e Laisy Leite que muito contribuíram para a realização deste trabalho, tornando nosso dia a dia mais alegre e harmonioso. Agradeço a oportunidade de aprender com vocês diariamente.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e a FACEPE pelo apoio técnico e financeiro.

Aos mestres que tanto contribuíram para minha formação.

À banca examinadora pela disponibilidade e gentileza em aceitar o convite.

À Dra. Ana Cristina Gales e equipe do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica pela contribuição.

À Dr. Antônio Rezende pela disponibilidade e apoio na realização deste trabalho.

Ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM pela contribuição nas reações de sequenciamento.

A toda a equipe do Laboratório de Microbiologia do CPqAM pelo carinho e amizade. Em especial à Fabiana Laura, Silvana Santos, Wagner Oliveira, Livia Alves e Érica Vieira.

A todos que fazem o Hospital da Restauração pelo apoio e amizade, em especial a Eva Ângela Coelho e Helíade Spinelli.

Agradeço a todos,
Camylla Carvalho de Melo

MELO, Camylla Carvalho. **Aspectos fenotípicos e moleculares de isolados de *Acinetobacter baumannii* relacionados à infecção nosocomial**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

RESUMO

Acinetobacter baumannii, com sua capacidade de acumular resistência aos antibióticos e o seu potencial de formar biofilme, é uma das principais ameaças para infecções em ambiente hospitalar, chegando a se constituir problema de saúde pública. A resistência aos carbapenêmicos geralmente ocorre devido à expressão de oxacilinases e metalo- β -lactamases e a formação de biofilme pode estar relacionada à presença dos genes *bap* e *bla*_{PER-1}. Focando estas características, foram analisados 67 isolados de *A. baumannii* relacionados à infecção nosocomial provenientes de hospital da rede pública de saúde em Pernambuco. Foram obtidas informações através da amplificação e sequenciamento dos genes 16S rDNA, dos genes codificadores de oxacilinases e de metalo- β -lactamases e de genes relacionados à produção de biofilme. As sequências do 16S rDNA confirmaram a identificação de 66 dos isolados; o outro isolado apresentou limitação em sua identificação. O gene *bla*_{OXA-143-like} foi encontrado em 34 isolados (50,7%), *bla*_{OXA-23-like} em 12 isolados (17,9%), *bla*_{OXA-24-like} em 10 isolados (14,9%) e o gene, *bla*_{OXA-51-like}, intrínseco, foi encontrado em 66 isolados (98,5%) e apresentou polimorfismo, indicando-o como potencial marcador para tipagem molecular. Os genes *bla*_{OXA-58-like}, *vim*, *spm*, *imp* e *bla*_{PER-1} não foram encontrados. O gene *bap* foi encontrado em 58 isolados (86,5%), destes, 18 isolados (31%) apresentaram um produto de amplificação maior que o esperado. A análise das sequências mostrou que nestes isolados havia uma inserção do gene *dacD*, relacionado a proteína ligadora de penicilina (PBP), o qual pode ter inativado o gene *bap* e causado diminuição na produção de biofilme observada no teste fenotípico. O teste fenotípico para avaliar a formação de biofilme apresentou aderência positiva e moderada em 37 isolados (55,2%). Estes achados apontam a necessidade de um monitoramento acurado do *A. baumannii* para orientar o tratamento e controle no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: Infecção hospitalar, *Acinetobacter baumannii*, carbapenêmicos, biofilme.

MELO, Camylla Carvalho. **Phenotypic and molecular aspects of *Acinetobacter baumannii* isolates related to nosocomial infection**. 2014 Dissertation (Master of Bioscience and Biotechnology for Health) - Centro Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

ABSTRACT

The carbapenem resistance is often due to the existence of oxacilinases and metallo- β -lactamases. Biofilm formation may be related to the presence of *bap* and *bla*_{PER-1} genes. . 67 isolates of *A. baumannii* related to nosocomial infections from a public hospital in the state of Pernambuco, were analyzed. Of these, 61 (91%) were resistant to carbapenems. The identification of the isolates was confirmed by amplification and sequencing of the 16S gene. The encoding genes of oxacilinases, the genes related to the biofilm production and the encoding genes of metallo- β -lactamases were researched by PCR and the identity was confirmed by sequencing. The sequences of the 16S confirmed the identification of isolates, the other isolate showed polymorphism. The gene *bla*_{OXA-23-like} was found in 12 isolates (17.9%), *bla*_{OXA-24-like} in 10 isolates (14.9%), and the *bla*_{OXA-51-like} was found in the 66 isolates (98.5%) that showed polymorphism, indicating this gene as marker for molecular typing. The *bla*_{OXA-143-like} was in 34 isolates (50.7%) and the *bla*_{OXA-58-like}, *vim*, *spm*, *imp* e *bla*_{PER-1} wasn't found in any of the isolates. The phenotypic test to assess biofilm formation showed positive adherence and moderated adherence in 37 isolates (55.2%), and of these, 9 (24.3%) amplified the *bla*_{OXA-23-like} gene, 3 (8,1%) the *bla*_{OXA-24-like} gene, 37 (100%) the *bla*_{OXA-51-like} gene and 21 (56,7%) the *bla*_{OXA-143-like} gene. The *bap* gene was found in 58 isolates (86.5%), and of these, 18 isolates (31%) showed a higher than expected amplification product. After the sequencing analysis it was found that there was an insertion of ISAbal25/*dacD*, and may have inactivated the *bap* gene, causing a decrease in the biofilm production. The characterization of aspects related to pathogenicity and antimicrobial resistance may contribute to a better understanding of the infections dynamic and guide more objective for the prevention and control of the spread of microorganisms in the hospital.

Keywords: Nosocomial infection, *Acinetobacter baumannii*, carbapenems, biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1- Espécies de <i>Acinetobacter</i> descritas.....	13
Figura 1- Cadeia de transmissão do micro-organismo no ambiente hospitalar.....	16
Figura 2- Surtos de <i>Acinetobacter baumannii</i>	17
Quadro 2- Classificação das β -lactamases.....	24
Figura 3- Resumo da distribuição e contexto genético das enzimas do tipo OXA em <i>Acinetobacter baumannii</i>	25
Quadro 3- Metalo- β -lactamases descritas em <i>Acinetobacter</i>	30
Quadro 4- Sequências dos <i>primers</i> utilizados nesse estudo.....	37
Figura 4- Teste fenotípico para detecção de biofilme.....	39
Figura 5- Produtos de PCR do gene 16S rDNA de ~1500 pb a partir do DNA total de cepas de <i>A. baumannii</i>	41
Figura 6- Árvore filogenética do gene 16S construída através do programa MEGA v.6 utilizando o método Neighbor Joining	42
Figura 7- Produtos de PCR do gene <i>bla</i> _{OXA-51-like} de 353 pb a partir do DNA total de cepas de <i>A. baumannii</i>	43
Figura 8- Produtos de PCR do gene <i>bla</i> _{OXA-23-like} de 501 pb a partir do DNA total de cepas de <i>A. baumannii</i>	44
Figura 9- Produtos de PCR do gene <i>bla</i> _{OXA-24-like} de 246pb a partir do DNA total de cepas de <i>A. baumannii</i>	45
Figura 10- Produtos de PCR do gene <i>bla</i> _{OXA-24} de 800pb a partir do DNA total de cepas de <i>A. baumannii</i>	46
Figura 11- Produtos de PCR do gene <i>bla</i> _{OXA-143-like} de ~200pb a partir do DNA total de cepas de <i>A. baumannii</i>	47
Figura 12- Produtos de PCR do gene <i>bap</i> a partir do DNA total de cepas de <i>A. baumannii</i>	48
Figura 13- Localização dos <i>primers</i> <i>bap</i> 2 (setas em verde) que contemplam a região central dos isolados com amplificação de fragmento >1000 pb do gene <i>bap</i>	49
Quadro 5- Isolados provenientes dos mesmos pacientes que apresentaram diferenças na presença do gene <i>bap</i> e produção de biofilme em teste fenotípico.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantitativo de isolados analisados por sítios de coleta.....	34
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>
BGN-NF	Bacilo gram-negativo não fermentador
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool-nucleotide</i>
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EU	<i>European Clone</i>
MBLs	Metallo- β -lactamases
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MLST	<i>MultiLocus Sequence Typing</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NNIS	<i>National Nosocomial Infection Surveillance</i>
OMPs	<i>Outer Membrane Proteins</i>
OXA	Oxacilinase
PBP	<i>Penicillin binding protein</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDR	<i>Pandrug resistant</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
SCOPE	<i>Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance</i>
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MARCO TEÓRICO	12
2.1 Características do gênero <i>Acinetobacter</i>	12
2.1.1 Taxonomia.....	12
2.1.2 Habitat.....	14
2.2 Aspectos relacionados às infecções nosocomiais	15
2.3 Epidemiologia das infecções	16
2.4 Tratamento	18
2.5 Identificação laboratorial	18
2.6 Genoma	19
2.7 Fatores de virulência e patogenicidade	20
2.7.1 Biofilme.....	21
2.8 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos	22
2.8.1 β -lactamases.....	23
2.8.1.1 <i>Oxacilinas</i>	24
2.8.1.2 <i>Metalo-β-lactamases</i>	27
2.8.2 Outros mecanismos de resistência.....	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivos específicos	33
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	34
5.1 Obtenção e estoque dos isolados	34
5.2 Identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos	35
5.3 Extração de DNA	35
5.4 Confirmação da identidade bacteriana	35
5.5 Deteccção dos genes de resistência	36

5.6 Detecção dos genes relacionados à produção de biofilme.....	38
5.7 Teste fenotípico para detecção do biofilme.....	38
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	40
7 RESULTADOS.....	41
8 DISCUSSÃO.....	51
9 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICE A- Resultados obtidos neste estudo.....	64

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um patógeno oportunista responsável por numerosos tipos de infecções, como pneumonias, bacteremias, infecções urinárias e meningites acometendo especialmente pacientes imunocomprometidos. É considerado como um problema de saúde pública devido à sua capacidade de sobrevivência por longos períodos no ambiente, aquisição de múltiplos mecanismos de resistência e rápido poder de disseminação.

Nos últimos anos, *A. baumannii* têm progressivamente acumulado resistência a vários antibióticos utilizados na rotina clínica, fazendo com que os carbapenêmicos, drogas de reserva, se tornassem a terapêutica antimicrobiana de escolha para o tratamento destas infecções. Diferentes mecanismos podem estar envolvidos com a resistência a estes fármacos. Para o gênero *Acinetobacter* a resistência específica aos carbapenêmicos está muitas vezes relacionada à perda de porinas e de forma mais significativa, à produção de β -lactamases da classe D (OXA-carbapenemases) e classe B (Metallo- β -lactamases). O tratamento destas infecções tem se tornado crítico, devido ao surgimento de cepas multirresistentes aos antibióticos e cuja disseminação tem sido associada à contaminação de equipamentos hospitalares devido à formação de biofilme em superfícies e/ou mãos colonizadas da equipe assistencial.

A formação de biofilme em *Acinetobacter* é considerada fator de virulência, pois dificulta a ação de antimicrobianos e constitui uma importante fonte de transmissão do patógeno, uma vez que, pode estar presente em dispositivos utilizados ou implantados no paciente, bem como em superfícies no ambiente hospitalar. Esse recurso associado à resistência a múltiplas drogas pode contribuir para sobrevivência do micro-organismo e sua disseminação no ambiente hospitalar levando ao agravamento da morbidade dos pacientes.

Muitos dos mecanismos moleculares desenvolvidos pela espécie no processo de adesão às superfícies clinicamente relevantes e no desenvolvimento de mecanismos de resistência permanecem desconhecidos. O conhecimento destes mecanismos poderá auxiliar no entendimento de fatores celulares que contribuem para a disseminação da espécie e sua capacidade de causar infecções graves, bem como no desenvolvimento de alvos novos para eliminar o micro-organismo de superfícies, para que assim, juntamente com o conhecimento da epidemiologia local das infecções, seja estabelecido o controle de *A. baumannii*.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Características do gênero *Acinetobacter*

Acinetobacter baumannii se apresenta como coco bacilo gram-negativo, aeróbio estrito, não fermentador, imóvel, catalase positiva, oxidase negativa, não fastidioso (HOWARD *et al.*, 2012). A maioria das espécies cresce bem em ágar MacConkey, produzindo uma coloração rosa, devido à oxidação fraca da lactose (PELEG *et al.*, 2008).

As provas presuntivas para a identificação das espécies do gênero *Acinetobacter* incluem a ausência de citocromo-oxidase, motilidade negativa e resistência à penicilina. *A. baumannii* é sacarolítico e utiliza os carboidratos de forma oxidativa no meio oxidação-fermentação (OF) (WINN *et al.*, 2006).

2.1.1 Taxonomia

O gênero *Acinetobacter* (do grego *akinetos*: não-móvel), pertence à família Moraxellaceae. Ao longo dos últimos 30 anos, a história taxonômica deste gênero foi amplamente modificada. O primeiro micro-organismo foi descrito em 1908 como *Diplococcus mucosus*, depois em 1911, denominado por Beijerinck, como *Micrococcus calcoaceticus*, e mais tarde em 1954 foi classificado como *Acinetobacter spp.* de acordo com suas características fenotípicas (PELEG *et al.*, 2008).

Através de técnicas de hibridização de DNA, 12 grupos diferentes foram propostos (genoespécies) dentro do gênero *Acinetobacter*, que podiam ser diferenciados por 28 testes fenotípicos (BOUVET; GRIMONT, 1986). A realização de amplo painel de testes fenotípicos constitui procedimento demorado e dispendioso, não utilizado rotineiramente.

Atualmente, após a utilização dos métodos de biologia molecular, são reconhecidas 28 genoespécies (quadro 1). As genoespécies 1 (*Acinetobacter calcoaceticus*), 2 (*Acinetobacter baumannii*), 3 (*Acinetobacter pittii*) e 13TU (*Acinetobacter nosocomialis*) estão agrupadas no Complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* (Ac-Ab). Sendo as espécies *A. baumannii* e *A. calcoaceticus* clinicamente importantes. Estas espécies não são distinguíveis uma da outra pelos métodos fenotípicos de rotina (ALLEN, HARTMAN, 2010). Dos métodos validados para identificação das espécies, a hibridização DNA-DNA foi utilizada durante muito tempo como referência padrão. Porém, devido à dificuldade de acesso,

esses métodos são realizados apenas em poucos laboratórios de referência (BOUVET; GRIMONT, 1986).

Quadro 1- Espécies de *Acinetobacter* descritas.

Espécie	Referência
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Bouvet; Grimont, 1986
<i>Acinetobacter baylyi</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2009
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2010
<i>Acinetobacter bouvetii</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter brisouii</i>	Anandham <i>et al.</i> , 2010
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Baumann <i>et al.</i> , 1968
<i>Acinetobacter gerneri</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2010
<i>Acinetobacter grimontii</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter junii</i>	Bouvet; Grimont, 1986
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2009
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Bouvet; Grimont, 1986
<i>Acinetobacter indicus</i>	Malhotra <i>et al.</i> , 2012
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Bouvet; Grimont, 1986
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Brisou; Prévot, 1954
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2011
<i>Acinetobacter parvus</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2001
<i>Acinetobacter pittii</i>	Nemec <i>et al.</i> 2011
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Nishimura <i>et al.</i> , 1988
<i>Acinetobacter rudis</i>	Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2011
<i>Acinetobacter schindleri</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2001
<i>Acinetobacter soli</i>	Kim <i>et al.</i> , 2009
<i>Acinetobacter tandoii</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter townneri</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter ursingii</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2001
<i>Acinetobacter venetianus</i>	Vaneechoutte <i>et al.</i> , 2009

Fonte: A autora

2.1.2 Habitat

Amplamente distribuído na natureza, *Acinetobacter*, é facilmente recuperável a partir de superfícies úmidas e secas. Pode ser encontrado no solo, esgoto, água de consumo (incluindo frutas e vegetais), na pele saudável ou lesionada, bem como em outros locais do corpo como as membranas mucosas (HOWARD *et al.*, 2012).

A utilização de equipamentos médicos não completamente descontaminados durante o manuseio do paciente, tais como ventiladores, respiradores, e monitores de pressão arterial, tem sido implicada na transmissão de *A. baumannii*. O micro-organismo também tem sido encontrado em colchões, travesseiros, aparelhos de televisão e ventiladores, que podem servir de fômites durante os surtos (JAWAD *et al.*, 1998).

As roupas de cama também apresentam um papel importante na disseminação nosocomial do organismo e na persistência de surtos. Estudos relatam que isolados de *A. baumannii* podem sobreviver em superfícies, por vários dias. Em estudo realizado na Alemanha, a média de sobrevivência destes isolados em superfícies foi de 27 dias, porém algumas cepas sobreviveram até 33 dias (GIAMARELLOU *et al.*, 2008; JAWAD *et al.*, 1998), período longo quando comparado a outros micro-organismos.

Altas taxas de colonização de pele, trato digestivo e respiratório têm sido observados em pacientes hospitalizados, sendo a orofaringe um sítio predominante de colonização, uma vez que as mucinas presentes na cavidade oral atuam como receptores de aderência bacteriana (KOELEMAN *et al.*, 2001).

Devido a sua resistência em condições de baixa umidade, o micro-organismo já foi isolado de ambiente seco, constituindo fonte de infecção para membros das Forças Armadas que atuam em zonas de conflito em regiões desertas, como o Iraque e Golfo Pérsico (HOWARD *et al.*, 2012). Também já foi observada a presença de *Acinetobacter* em piolhos coletados de pessoas desabrigadas, sugerindo um novo reservatório para o micro-organismo (SCOLA *et al.*, 2004). O ambiente hospitalar (ar e superfícies) também pode abrigar o micro-organismo principalmente onde se encontram pacientes colonizados. Em estudo realizado por Sergeant *et al.* (2012), observou-se que o ambiente era frequentemente contaminado durante a realização de curativos.

2.2 Aspectos relacionados às infecções nosocomiais

A infecção hospitalar ou infecção relacionada à assistência a saúde (IRAS), se apresenta quando o paciente possui sinais ou sintomas de infecção que surgem a partir de 72 horas após a sua admissão no hospital, ou antes, desse período, quando associadas a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos realizados no ambiente hospitalar, de acordo com a portaria nº 2.616/98 do Ministério da Saúde. Em relação à espécie *A. baumannii* o paciente pode estar apenas colonizado pelo micro-organismo, sem manifestação clínica de infecção, mas atuando como agente portador e transmissor (HOWARD *et al.*, 2012).

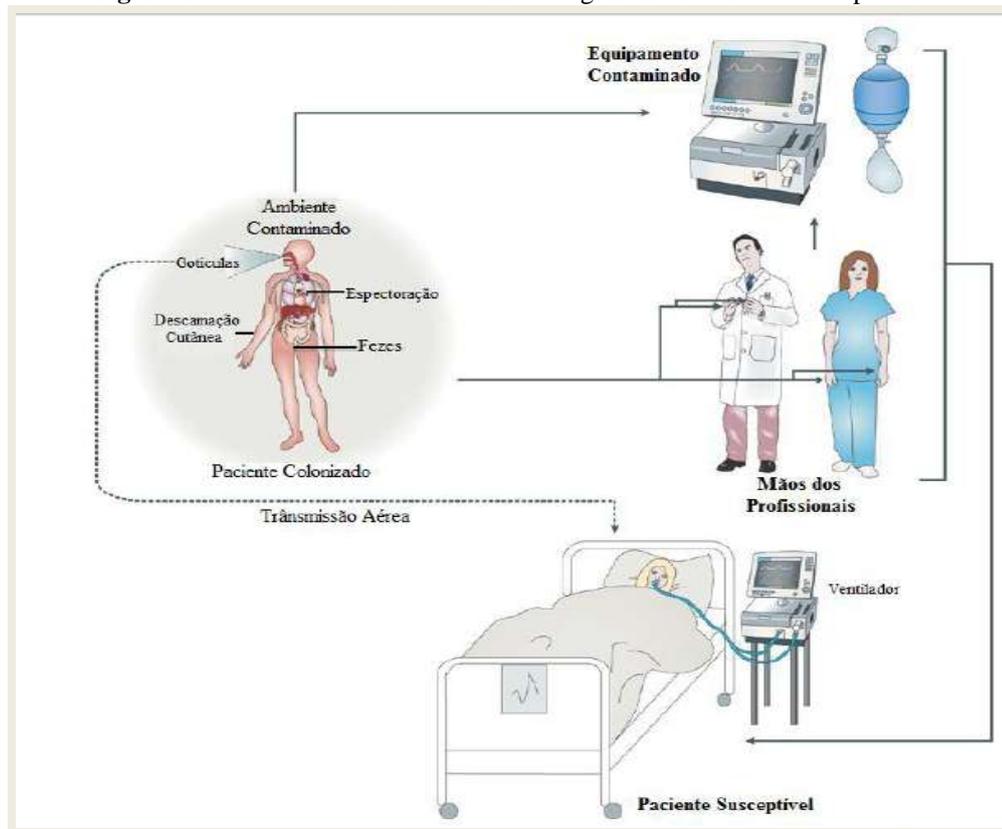
As infecções nosocomiais causadas por *A. baumannii* são consideradas oportunistas, ocorrendo geralmente em pacientes imunossuprimidos, com doenças graves, que tenham sido submetidos a procedimentos invasivos ou tratados com antimicrobianos de amplo espectro. Ocorrem frequentemente em pacientes internados em UTI, onde causam pneumonia associada ao uso de ventilação mecânica, bacteremia ou infecção do trato urinário. Infecções como meningite, infecções em feridas cirúrgicas, tecidos e abdômen são menos frequentes, mas também são relatadas (PELEG *et al.*, 2008).

As infecções podem ser endêmicas, epidêmicas ou esporádicas. Infecções endêmicas são o principal alvo de atuação dos serviços de controle de infecção hospitalar, enquanto as infecções epidêmicas são definidas pela ocorrência de uma taxa de infecção estatisticamente maior quando comparada com o histórico da taxa de infecção da instituição (SINGH *et al.*, 2006). O *Centers for Diseases Control* (CDC) tem verificado taxas mais altas (50%) de infecções nosocomiais por *Acinetobacter spp.* nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) entre os meses de julho a outubro (verão) em relação a outros meses do ano, apontando para uma possível variação sazonal da incidência das infecções (MCDONALD *et al.*, 1996).

A ocorrência de infecção hospitalar depende da existência de uma fonte de infecção, da transmissão do agente e da suscetibilidade do paciente. Para prevenir as infecções adquiridas no hospital este ciclo deve ser interrompido (CARNEIRO; SARIDAKIS, 2008). A figura 1 mostra a cadeia de transmissão do micro-organismo no ambiente hospitalar.

A infecção de corrente sanguínea foi relatada em 10-30% dos pacientes infectados por *A. baumannii*, principalmente em pacientes adultos com doenças malignas, queimados, cirurgiados e poli-traumatizados. De forma secundária à infecção, foi observada colonização em outros sítios como trato respiratório e trato intestinal (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004).

Figura 1- Cadeia de transmissão do micro-organismo no ambiente hospitalar.



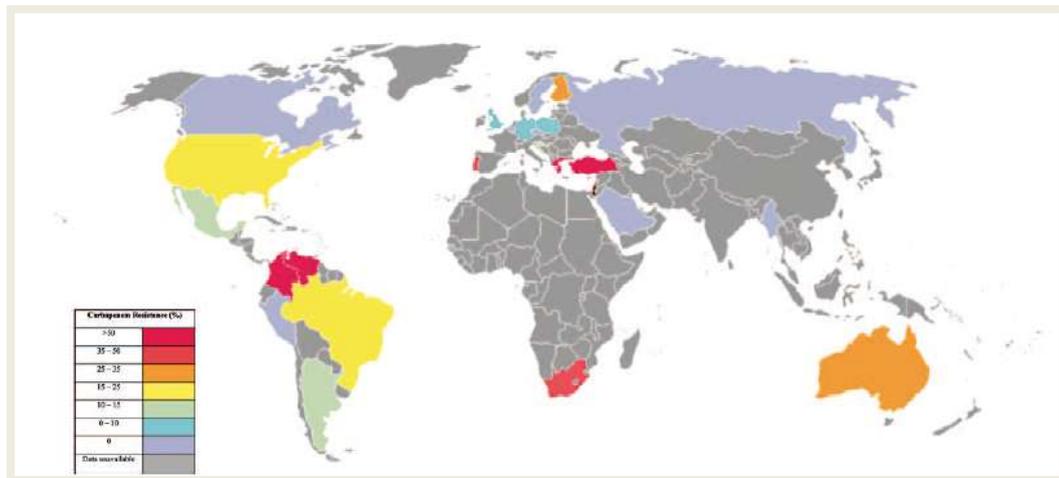
Fonte: Dirjkshoorn *et al.* (2007).

2.3 Epidemiologia das Infecções

A disseminação de cepas de *A. baumannii* tem sido descrita em diversos países. Na Europa, alguns estudos têm associado os surtos à disseminação dos três clones Europeus (*European Clone* – EU – I, II e III) (COELHO *et al.*, 2006). Esses clones possuem grande capacidade adaptativa, geralmente apresentam resistência a diversos antimicrobianos e são de difícil controle (DIJKSHOORN *et al.*, 2007).

A emergência de cepas de *A. baumannii* multidroga resistentes (MDR) provocando infecções nosocomiais também tem atingido vários países da América, Europa e demais continentes (PEREZ *et al.*, 2007), provocando numerosos surtos globais (PELEG *et al.*, 2008) (Figura 2).

Figura 2- Surtos hospitalares de *Acinetobacter baumannii*.



Fonte: Perez *et al.* (2007).

Legenda: Em vermelho observam-se as maiores taxas de resistência a carbapenêmicos

Em 1991, na América do Norte, *A. baumannii* MDR foi responsável por surtos em hospitais de Nova Iorque (GO *et al.* 1994), com transmissão de cepas geneticamente indistinguíveis entre os pacientes hospitalizados. De acordo com dados coletados do *National Nosocomial Infection Surveillance* (NNIS), no período de 1986 a 2003, as infecções causadas por bacilos gram-negativos em UTI americanas tornaram-se crescentes ao longo dos anos (GAYNES, EDWARDS *et al.*, 2005).

Na América Latina, dados obtidos através do programa de vigilância de resistência a antimicrobianos *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY), relataram a susceptibilidade antimicrobiana de 826 isolados de *Acinetobacter spp.* durante os anos de 1997-2001. O Brasil contribuiu com o maior número de isolados (n=400). Foi observada diminuição da susceptibilidade aos carbapenêmicos durante o período, com até 40% das amostras resistentes a essa classe de antimicrobianos na Argentina e de 2,2-13,6% no Brasil, onde seis isolados apresentaram resistência a polimixina B. A taxa de resistência dos isolados procedentes das UTI foi duas vezes maior quando comparada com a taxa de resistência em outros setores do hospital (TOGNIM *et al.*, 2004).

Em estudo multicêntrico realizado em 2011 pelo projeto *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance* (SCOPE) foi avaliada a epidemiologia e microbiologia das infecções de corrente sanguínea de 16 hospitais das cinco regiões brasileiras, demonstrando a presença de *Acinetobacter spp.* em 11,4% das infecções com taxa de resistência aos carbapenêmicos de 55,9% e mortalidade de 65,5% (MARRA *et al.*, 2011).

2.4 Tratamento

Até o início dos anos 70, infecções nosocomiais causadas por *A. baumannii* eram tratadas com sucesso com gentamicina, minociclina, ácido nalidíxico, ampicilina, ou carbenicilina, tanto sozinhos quanto combinados, mas taxas crescentes de resistência começaram a ser divulgadas entre 1971 e 1974. Desde 1975, surtos sucessivos têm demonstrado o aumento da resistência em isolados clínicos desta espécie (PELEG *et al.*, 2008).

Infecções causadas por *A. baumannii* podem ser tratadas com fluoroquinolonas, carbapenêmicos e sulbactam, desde que o micro-organismo apresente perfil de sensibilidade em testes laboratoriais. Os carbapenêmicos são os β -lactâmicos de maior espectro e considerados como a melhor opção terapêutica para infecções graves causadas por *A. baumannii*. Entre as características responsáveis pela sua escolha na utilização estão: o baixo peso molecular, que permite uma rápida penetração através das membranas, sua elevada afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina (PBP) e sua grande estabilidade frente à hidrólise pela maioria das β -lactamases. O tratamento, com carbapenêmicos, de infecções nosocomiais por bactérias gram-negativas multirresistentes é, em algumas ocasiões, o último recurso terapêutico disponível (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2008). Entretanto, a resistência a essa classe de drogas, torna as polimixinas (colistina e polimixina B) a última escolha, levando, porém, a efeitos adversos como toxicidade renal (JONES *et al.*, 2007).

Atualmente, a tigeciclina constitui uma alternativa ao uso das polimixinas, pois tem apresentado atividade promissora *in vitro* contra muitos patógenos, incluindo cepas multirresistentes de *A. baumannii* (HOBAN *et al.*, 2005). Porém, casos de *A. baumannii* resistentes a tigeciclina já foram relatados na literatura, cuja resistência foi atribuída ao mecanismo de bombas de efluxo (PELEG *et al.*, 2007).

2.5 Identificação laboratorial

A identificação dos bacilos gram-negativos não-fermentadores (BGN-NF) sempre foi um desafio na rotina dos laboratórios de microbiologia. A maioria dos laboratórios não diferencia os BGN-NF em virtude da sua pouca incidência em amostras ambulatoriais, assim como pela complexidade e elevado custo dos esquemas completos de identificação fenotípica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). Por outro lado, um estudo realizado em hospital brasileiro apontou *Acinetobacter* multirresistente como o patógeno mais

frequente associado à colonização, seguido de *Staphylococcus* resistente a meticilina e *Pseudomonas aeruginosa* (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Para a identificação fenotípica dos isolados de *Acinetobacter spp.* é recomendada a realização de 28 testes fenotípicos, no entanto, nem todos os testes são utilizados rotineiramente na maioria dos laboratórios (BOUVET; GRIMONT, 1986). De acordo com a AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2004) a identificação do gênero pode ser realizada utilizando os seguintes testes: coloração de Gram, oxidase, motilidade, OF-glicose, crescimento a 42°C, citrato, gelatina e observação da hemólise em ágar sangue.

Métodos automatizados de identificação como o Vitek® 2, são utilizados para identificação da maioria dos BGN-NF, mas o banco de dados é limitado e os substratos (açúcares e enzimas) não são específicos para o gênero *Acinetobacter*. Em estudo realizado com 25 isolados de *Acinetobacter*, o Vitek® 2 identificou erroneamente 24% destes isolados (CONEJO *et al.*, 2001).

Dos métodos validados para identificação genotípica das espécies, a hibridização DNA-DNA foi considerada durante muito tempo como referência padrão. Porém, a identificação de *A. baumannii* através da detecção do gene específico *bla_{OXA-51}* também tem sido utilizada (TURTON *et al.*, 2006). O método de PCR multiplex associado ao sequenciamento dos genes *gyrB* e *rpoB* também pode ser utilizado com segurança na identificação de *A. baumannii* (ZANDER *et al.*, 2013), bem como o sequenciamento do gene 16S rDNA, uma vez que esse gene apresenta-se conservado entre as espécies (ALMEIDA; ARAÚJO, 2013).

Outros métodos moleculares têm sido desenvolvidos tanto para identificação das espécies de *Acinetobacter*, como para verificação da similaridade genética entre as cepas, dentre elas *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), sequenciamento do gene *rpoB*, da sub-unidade beta da RNA polimerase (HOWARD *et al.*, 2012), *MultiLocus Sequence Typing* (MLST) (ZARRILLI *et al.*, 2013) e *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) (PELEG *et al.*, 2008).

2.6 Genoma

Até o momento foram sequenciados oito genomas completos de *A. baumannii* e cerca de 60 estão em andamento. Todos os genomas apresentaram um cromossomo circular de aproximadamente 4Mb, conteúdo GC de aproximadamente 39% , cerca de 3.400 a 4.000

genes e o número de plasmídeos encontrados variou entre zero e quatro (IMPERI *et al.*, 2011).

Em estudo conduzido por Vallenet *et al.* (2008) foram sequenciados os genomas de três cepas: uma cepa de *A. baumannii* MDR isolada de humano, uma cepa multisensível isolada de piolho e uma cepa de *A. baylyi* isolada de ambiente. A cepa isolada de ambiente possuía poucos elementos de inserção quando comparada as outras cepas. Neste estudo, observou-se que a cepa multirresistente possuía uma grande ilha de resistência (86kb) onde foram encontrados 45 dos 52 genes de resistência já identificados. Dentro desta região foram encontrados 88 quadros abertos de leitura (*open reading frames* - ORF), das quais 82 já foram identificados em *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.* Também foram identificados transposons, integrons e elementos de inserção (*insertional sequences* - IS) que não foram encontrados na cepa sensível. Ilhas de resistência semelhantes já foram descritas em outras cepas epidêmicas: a ilha AbaR22 de 38,6 kb foi encontrada em cepa pertencente ao clone Europeu II e amplamente distribuída na China (ZHOU *et al.*, 2011).

Em trabalho descrito por Iacono *et al.* (2008), foi realizada análise comparativa dos genomas de uma cepa epidêmica de *A. baumannii* (ACICU), a cepa padrão ATCC 17978 e a cepa de *A. baylyi* ADP1. Foi observado que a cepa ACICU possuía um único cromossomo circular 3.904.116 pb (~3.758 genes), 14 IS no cromossomo (7 ISAb125, 4 ISAb2, 2 IS26 e 1 ISper12), 11 IS em plasmídeo (3 ISAb3, 3 IS26, 4 ISAb2, 1 ISAb125) e dois plasmídeos (pACICU1 e pACICU2). Esta cepa apresentou 85% similaridade com *A. baumannii* ATCC17978 e 14,8% com *A. baylyi* ADP1 e possuía regiões exclusivas, não pertencentes aos genomas comparados.

A. baumannii apresenta facilidade de aquisição de elementos relacionados à resistência, contribuindo para sua propagação nas unidades de saúde. Estes estudos mostraram o uso do sequenciamento como ferramenta para alcançar um rápido *insight* sobre a fisiologia, patogenicidade e base molecular da resistência antimicrobiana (IACONO *et al.*, 2008; VALLENET *et al.*, 2008).

2.7 Fatores de virulência e patogenicidade

Apesar da existência de dados clínicos e epidemiológicos consideráveis em relação ao papel do *A. baumannii* em infecções nosocomiais, os fatores de virulência específicos e mecanismos de patogenicidade do micro-organismo ainda não estão bem elucidados (HOWARD *et al.*, 2012). A capacidade de se manter viável por longos períodos em

superfícies secas e de captar nutrientes essenciais como o ferro e a secreção de enzimas que causam dano tecidual são fatores importantes na manutenção da infecção causada pelo micro-organismo (PELEG *et al.*, 2008).

Aproximadamente 30% das espécies de *Acinetobacter* produz exopolissacarídeo, que bloqueia o acesso do sistema complemento à parede celular bacteriana, impedindo sua ativação. A produção de exopolissacarídeo por uma bactéria patogênica é considerada um fator de virulência devido à proteção que confere ao micro-organismo contra as defesas do hospedeiro (JOLY-GUILLOU *et al.*, 2005).

2.7.1 Biofilme

A formação de biofilme é também um importante fator de virulência, pois facilita a adesão bacteriana a materiais plásticos como cateteres e tubos de ventilação mecânica, favorecendo a colonização e infecção dos pacientes (LEE *et al.*, 2008). Esta formação ocorre através de etapas sequenciais em que a fixação inicial do micro-organismo à superfície é seguida de proliferação e acúmulo de grupos de células em várias camadas formando uma matriz polimérica, cuja composição é complexa e variável entre as diferentes espécies microbianas, ou até mesmo sob diferentes condições ambientais (LASA; PENADÉS, 2006).

Em estudo realizado por Sanchez *et al.* (2013) foi avaliada a formação de biofilme em 53 cepas de *A. baumannii* isoladas de amostras clínicas. A formação de biofilme foi mais frequente nas cepas resistentes aos aminoglicosídeos, carbapenêmicos, tetraciclina e sulfonamidas quando comparadas às cepas que apresentaram sensibilidade.

Há vários genes relacionados à formação de biofilme em *A. baumannii*. O gene *csuA* responsável pela produção do *pili*, é considerado essencial na formação inicial do biofilme, permitindo adesão das células bacterianas a superfícies abióticas dando origem a microcolônias que precedem a formação do biofilme. Já o gene *csuE*, codificador de adesina, quando inativado gera alteração da função do *pili* interferindo na formação do biofilme (GADDY; ACTIS, 2009).

A adesividade celular e a produção de biofilme foram significativamente maiores em isolados de *A. baumannii* portadores do gene *bla_{PER-1}* relacionado à resistência a antibióticos betalactâmicos quando comparados a isolados que não possuíam o gene (LEE *et al.*, 2008). Mais recentemente foi demonstrado que, em isolados de *A. baumannii*, a proteína associada ao biofilme (Bap), homóloga a proteína Bap inicialmente descrita em *Staphylococcus aureus*, é formada por 8.621 aminoácidos e codificada pelo gene *bap* o qual está relacionado com o

amadurecimento e manutenção do biofilme sobre superfícies, incluindo polipropileno, poliestireno e titânio. O estudo revelou que essa proteína tem papel importante na formação de biofilme em superfícies clinicamente relevantes, bem como na adesividade a células eucarióticas indicando sua importância no processo de colonização do hospedeiro. O estudo sugere a proteína Bap como potencial alvo para estudos futuros relacionados ao desenvolvimento de novos antimicrobianos que poderiam atuar em superfícies ajudando a eliminar o micro-organismo diminuindo sua propagação (BROSSARD, CAMPAGNARI, 2011).

Fatores de virulência como o biofilme, associados à resistência a múltiplas drogas podem contribuir para a sobrevivência do micro-organismo e sua disseminação no ambiente hospitalar gerando agravamento da morbidade. Existem poucos relatos sobre a base molecular e bioquímica destes fatores de virulência e seu real envolvimento nas infecções humanas. Provavelmente isso se deve ao fato de que somente a partir da última década, *A. baumannii* tem sido considerado um patógeno de maior relevância, principalmente devido aos múltiplos mecanismos de resistência antimicrobiana (MARTINS, 2013).

2.8 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Frequentemente, isolados de *A. baumannii* são classificados como multi-droga-resistentes (MDR), extensivamente-droga-resistentes (XDR) e pan-droga-resistentes (PDR) de acordo com a sua resistência a uma ou mais classes de antibióticos. Assim, cepas resistentes a três ou quatro classes de drogas são classificadas como MDR; aquelas resistentes a cinco ou seis classes de antimicrobianos são denominadas XDR; e cepas resistentes às sete classes de antibióticos testados são consideradas PDR, apresentando o tipo mais absoluto de resistência, pois não há antimicrobianos com atividade contra essas cepas (MAGIORAKOS *et al.*, 2011).

Diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos foram descritos para o gênero *Acinetobacter*, em particular os mecanismos enzimáticos, tais como a produção de oxacilinas e β -lactamases que possuem atividade contra os antibióticos carbapenêmicos. A resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos é mais comumente mediada por oxacilinas do que por metalo- β -lactamases (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

Dentre os mecanismos não-enzimáticos relatados, os mais observados são as bombas de efluxo, que contribuem para uma diminuição da concentração do antibiótico no interior da célula, alterações no sítio de ligação do antibiótico proporcionando a perda de sua atividade, e

alteração na expressão dos canais de porina dificultando a penetração e ação dos antibióticos (GIAMARELLOU *et al.*, 2008).

A resistência adquirida, tanto pela transferência horizontal de elementos móveis carreadores de multirresistência (transposons e plamídeos) entre a mesma espécie e outras espécies, como a aquisição de elementos de inserção cromossomal (integrons), está entre os mecanismos genéticos mais observados no gênero *Acinetobacter* (PELEG *et al.*, 2008).

2.8.1 β -lactamases

As β -lactamases são enzimas que rompem o anel β -lactâmico inativando o antibiótico. Essas enzimas estão agrupadas em quatro classes moleculares A, B, C e D, baseadas na homologia da sequência dos aminoácidos, segundo a classificação de Ambler (tabela 2). Aquelas que pertencem às classes A, C e D são denominadas serina- β -lactamases, pois possuem serina no sítio ativo, e aquelas que pertencem à classe B são denominadas metalo- β -lactamases, pois contêm um ou dois íons de zinco no sítio ativo. Estas enzimas têm a propriedade comum de hidrolisar, ao menos parcialmente, imipenem ou meropenem, além de hidrolisar outras penicilinas e cefalosporinas (JIN *et al.*, 2004).

As β -lactamases também podem ser classificadas de acordo com Bush (quadro 2). Nesta classificação três grupos de enzimas são definidos pelo seu substrato e perfil de inibição: grupo 1) cefalosporinases – não são inibidas pelo ácido clavulânico; grupo 2) penicilinases, cefalosporinases e β -lactamases de amplo espectro – geralmente inibidas diretamente em seu sítio ativo; e grupo 3) metalo- β -lactamases – hidrolisam as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, e são pouco inibidas por quase todos os β -lactâmicos (BUSH, JACOBY, MEDEIROS, 1995).

Quadro 2- Classificação das β -lactamases.

Classificação Ambler	Classificação Bush	Substrato	Enzimas representativas
A	2a	Penicilinas	Penicilinases em Gram positivos
	2b	Penicilinas, cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1 TEM-3 a TEM-26, SHV-2, SHV-6,
	2be	Penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactams	<i>Klebsiella oxytoca</i> K1
	2br	Penicilinas	TEM-30 a TEM-36, TRC-1
	2c	Penicilinas e carbenicilina	PSE-1, PSE-3, PSE-4
	2e	Cefalosporinas	
	2f	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos	Cefalosporinases em <i>Proteus vulgaris</i> NMC-A em <i>Enterobacter cloacae</i> e SME-1 em <i>Serratia marcescens</i>
B	3	Maioria dos β -lactâmicos e carbapenêmicos	L1 de <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i> , Metallo-enzimas
C	1	Cefalosporinas	Enzimas AmpC em Gram negativos, MIR-1
D	2d	Penicilinas e cloxacilina	Enzimas OXA, PSE-2
-	4	Penicilinas	Penicilnase em <i>Pseudomonas cepacia</i>

Fonte: Bush, Jacoby e Medeiros, (1995).

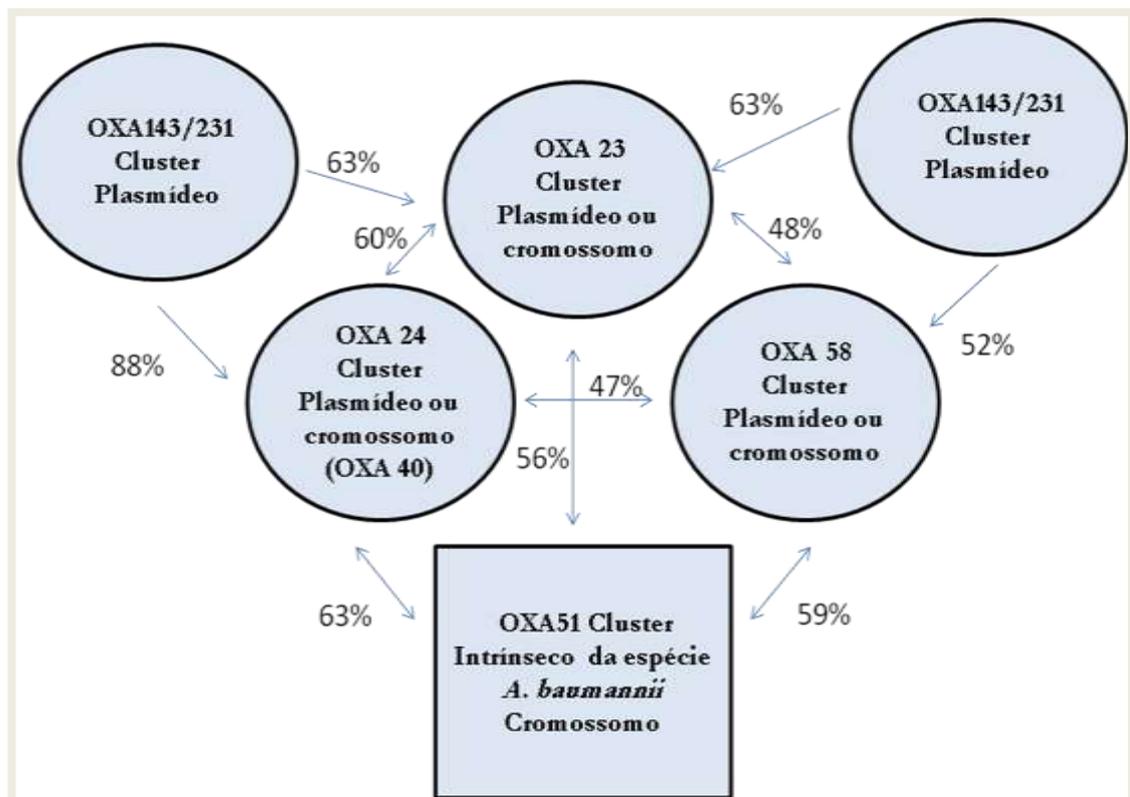
2.8.1.1 Oxacilinas

As oxacilinas pertencem à classe molecular D de Ambler e estão inclusas no grupo 2d da classificação de Bush. Geralmente hidrolisam oxacilina mais eficientemente que a benzilpenicilina. Hidrolisam também amoxicilina, metilcilina, cefaloridina e cefalotina. Embora a eficiência hidrolítica das oxacilinas contra carbapenêmicos seja muito menor do que a das metalo- β -lactamases (POIREL; NORDMANN, 2006), a frequência de genes codificadores das oxacilinas em *Acinetobacter spp.* é muito superior à frequência de genes que codificam metalo- β -lactactamases (KEMPFE *et al.*, 2012).

As carbapenemases tipo OXA produzidas por *A. baumannii* têm se disseminado rapidamente, sendo referidas na África, Europa, Oceania, América do Sul e Ásia (PELEG *et al.*, 2008). Em 1985, foi descoberta a primeira oxacilinase em um isolado de *A. baumannii*, na Escócia, sendo inicialmente denominada ARI-1 (*Acinetobacter* resistente a imipenem) e posteriormente renomeada como OXA-23 (OPAZO *et al.*, 2012).

Até o momento foram descritas cerca de 150 variantes de oxacilinases, divididas em oito grupos, porém apenas cinco foram descritas em *Acinetobacter spp.* (POIREL *et al.*, 2010) (Figura 3). Os subtipos de oxacilinases que possuem elevada similaridade genética fazem parte de um mesmo subgrupo filogenético. Em *Acinetobacter spp.* foram descritos cinco subgrupos: OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, OXA-143/OXA-231 (PELEG *et al.*, 2008,; ZARRILLI *et al.*, 2013). Esses grupos de genes podem ser encontrados no cromossomo ou em plasmídeos (KEMPFE *et al.*, 2012).

Figura 3- Esquema da distribuição e contexto genético das enzimas do tipo OXA em *Acinetobacter baumannii*.



Fonte: Adaptado de Peleg *et al.* (2008).

Legenda: As setas correspondem aos percentuais que representam os graus de homologia de aminoácidos entre as enzimas.

O primeiro grupo de oxacilinases cujo representante é a OXA-23, é composto também por OXA-27 e OXA-49, que diferem em 2 a 5 aminoácidos, com 99% de homologia (OPAZO

et al., 2011). No Brasil, a primeira descrição de OXA-23 foi em 1999, em Curitiba-PR (DALLA-COSTA *et al.*, 2003). Posteriormente, em 2009, foi descrita no Rio de Janeiro-RJ (CARVALHO *et al.*, 2009) e em Porto Alegre-RS (MARTINS *et al.*, 2009).

O perfil de hidrólise de OXA-23 e OXA-27 é muito semelhante: elas hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam e, fracamente, imipenem e meropenem. O ácido clavulânico inibe as oxacilinasas, exceto OXA-23, que é resistente a esse antibiótico (NORDMANN; POIREL, 2002). O gene *bla*_{OXA-23} foi encontrado no cromossomo e em plasmídeo (ZARRILLI *et al.*, 2013).

O segundo grupo de oxacilinasas é composto pelas enzimas OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 e OXA-72 e são codificadas por genes *bla*_{OXA-24-like} (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006). OXA-24 e OXA-25 foram identificadas em isolados de *A. baumannii* na Espanha, enquanto a OXA-26 foi isolada na Bélgica e OXA-40 na França, Espanha e Portugal (POIREL; NORDMANN, 2006). O primeiro relato de OXA-72 em *A. baumannii* foi descrito na Tailândia, em isolados resistentes a meropenem (LU *et al.*, 2009), e posteriormente encontrada na Croácia, no Brasil e na Itália (ZARRILLI *et al.*, 2013, WERNECK *et al.*, 2011, SÁ CAVALVANTI *et al.*, 2013). As enzimas que pertencem ao subgrupo OXA-24 diferem entre si geralmente em um a cinco aminoácidos.

A oxacilinase OXA-24 é codificada por genes localizados no cromossomo e não está associada a elementos de inserção (KEMPFE *et al.*, 2012). Possui atividade hidrolítica moderada contra carbapenêmicos e apresenta elementos estruturais característicos de β -lactamases de classe D. A sequência de aminoácidos contém regiões encontradas em serina β -lactamases, todas possuem a tétrede STFK (serina-treonina-fenilalanina-lisina), a região YGN (tirosina-glicina-asparagina) é substituída por FGN (fenilalanina-glicina-asparagina). A região KTG (lisina-treonina-glicina) é mantida nas OXA-23 e OXA-27, e substituída por KSG (lisina-serina-glicina) nas OXA-24, OXA-25 e OXA-26. A substituição de tirosina por fenilalanina pode ser significativa em consequência da possibilidade da hidroxila livre da tirosina poder exercer algum papel na hidrólise do anel β -lactâmico. No entanto, a substituição de treonina por serina na região KTG não é significativa, dada a semelhança entre os aminoácidos (BOU *et al.*, 2000).

O terceiro grupo das oxacilinasas é composto pelas enzimas OXA-51, OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-68, OXA-69, OXA-70, OXA-71, OXA-78, OXA-79 , OXA-80 e OXA-82 (PELEG *et al.*, 2008). Estas enzimas podem diferir em até 15 aminoácidos. As oxacilinasas representadas pelas variantes de OXA-51/69 são enzimas codificadas por genes cromossômicos naturalmente presentes em *A. baumannii* (POIREL; NORDMANN, 2006). A

migração da sequência de inserção (IS) IS*Aba1* para a região *upstream* ao gene *bla*_{OXA-51} pode promover a hipereexpressão deste gene, aumentando a CIM destes isolados frente ao imipenem (TURTON *et al.*, 2006).

Os genes *bla*_{OXA} são relacionados com uma variedade de estruturas genéticas, principalmente sequências de inserção, que têm um papel importante na expressão destes genes, especificamente IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3* que estão relacionadas ao aumento da expressão de *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-58} (KEMPFE *et al.*, 2012, OPAZO *et al.*, 2011).

O gene *bla*_{OXA-58} foi identificado pela primeira vez em *A. baumannii* em 2003, na França (PELEG *et al.*, 2008). Desde então, foi relatado em isolados de diversas regiões geográficas incluindo Espanha, Turquia, Romênia, Grécia, Áustria, Inglaterra, Argentina, Kuwait e Itália, e apresenta pouca semelhança com os grupos homólogos, compartilhando 59% com OXA-51 e menos de 50% de identidade com outros grupos (POIREL; NORDMANN, 2006).

O gene *bla*_{OXA-143} foi descrito em plasmídeos de cepas de *A. baumannii* isoladas no Brasil, em 2009 (HIGGINS *et al.*, 2009). Neste subgrupo inclui-se o gene *bla*_{OXA-231}, também encontrado em plasmídeo e descrito recentemente por Gionco *et al.* (2012) no Brasil. As enzimas codificadas por esses genes diferem entre si em apenas um aminoácido, o aspartato na enzima OXA-143 é substituído por alanina na enzima OXA-231, apresentam 88% de homologia de aminoácidos com enzimas do grupo OXA-24, 63% de identidade com OXA-23 e 52% com OXA-58 (ZARRILLI *et al.*, 2013).

2.8.1.2 Metallo- β -lactamases

A produção de enzimas tipo metalo- β -lactamases é uma das principais causas da redução de sensibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos (WALSH *et al.*, 2005). As metalo-enzimas pertencem à classe B de Ambler e ao grupo 3 de Bush e seus genes são localizados em plasmídeos e integrons. Hidrolisam carbapenêmicos, assim como todos os β -lactâmicos, com exceção do aztreonam, e requerem zinco para sua atividade, e por isso, são inibidas por compostos quelantes de cátions divalentes como o ácido etilendiamino tetraacético (*Ethylenediamine tetraacetic acid* – EDTA), não sendo afetadas pelos inibidores convencionais de β -lactamases como o tazobactam e o sulbactam (FOURNIER *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos sobre metalo- β -lactamases cromossômicas foram realizados em *Bacillus cereus* e *Stenotrophomonas maltophilia* e, devido ao sequenciamento genômico, cada vez mais genes localizados no cromossomo estão sendo descobertos (WALSH *et al.*, 2005).

No início da década de 90, outros genes que codificam as metalo- β -lactamases foram descritos em *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e em membros da família *Enterobacteriaceae* (HOWARD *et al.*, 2012).

Atualmente são descritos sete grupos de metalo- β -lactamases móveis, denominados: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase), GIM (*Germany* imipenemase), SIM (*Seoul* imipenemase), AIM (*Australian* imipenemase) e KHM (*Kyorin Hospital* metalo- β -lactamase) (MALTEZOU, 2009). Com exceção da enzima SPM-1, que é codificada por um gene localizado em plasmídeo, as demais são codificadas por genes localizados em integrons de classe 1. Os genes que codificam a enzima IMP também podem ser encontrados em integrons de classe 3 (WALSH *et al.*, 2005).

A primeira metalo- β -lactamase a ser caracterizada foi IMP-1 em 1988, em uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* no Japão (WALSH *et al.*, 2005). A subclasse IMP consiste de 18 variantes, oito já identificadas em *A. baumannii*: IMP-1 na Itália, Japão, Índia, Inglaterra, Coreia do Sul, Coreia do Norte e Brasil; IMP-2 na Itália e Japão; IMP-4 em Singapura e Hong Kong; IMP-5 em Portugal; IMP-6 no Brasil; IMP-8 na China; IMP-11 e IMP-19 no Japão (POIREL; NORDMANN, 2006, WALSH *et al.*, 2005, ZARRILLI *et al.*, 2013).

Em 2003, houve o primeiro relato da produção de enzimas tipo IMP (IMP-6) em um hospital brasileiro (GALES *et al.*, 2003). Posteriormente, em estudo retrospectivo realizado com amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas de pacientes internados no Hospital São Paulo, no período de maio de 1993 a novembro de 2001, observou-se resistência, ou sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos, com 54% dos isolados produtores de IMP-1 (TOGNIM *et al.*, 2006).

Em 1997, foi descoberta na Itália a metalo- β -lactamase tipo VIM-1 em um isolado clínico de *P. aeruginosa*. As metalo- β -lactamases tipo VIM possuem atualmente 13 variantes conhecidas, dentre as quais a VIM-2 que foi identificada em isolados de *A. baumannii*, na Coreia do Norte (QUEENAN *et al.*, 2007).

Em 1997, foi isolada a metalo- β -lactamase SPM-1 (São Paulo metalo- β -lactamase), em amostra clínica de *P. aeruginosa* no Hospital São Paulo/UNIFESP (TOLEMAN, *et al.*, 2002). Em 2002, a enzima GIM-1 (*Germany* imipenemase), o quarto grupo de metalo- β -lactamase a ser caracterizado, foi isolada de amostras clínicas de *P. aeruginosa* na Alemanha (CASTANHEIRA *et al.*, 2004).

A enzima SIM-1 é um membro da sub-classe de metalo- β -lactamase B1 e possui grande similaridade com as enzimas tipo IMP (69% de identidade com IMP-12 e 64% com

IMP-9) (LEE *et al.*, 2005). O gene *bla*_{SIM-1} foi detectado em sete isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes da Coreia entre 2003 e 2004 (ZARRILI *et al.*, 2013).

Em 2008, foi descrita em Nova Déli uma nova metalo- β -lactamase, a NDM-1 (*New Delhi* metalo- β -lactamase), isolada de enterobactérias (NORDMANN *et al.*, 2011). Posteriormente, essa enzima foi detectada em uma cepa de *A. baumannii* isolada na Índia, sendo também encontrada na Alemanha, Argélia, Bélgica, Bangladesh, China e na República Checa (ZARRILI *et al.*, 2013).

Além disso, uma NDM variante, a NDM-2, também foi encontrada em isolados de *A. baumannii* do Egito, Emirados Árabes e Israel. Os genes *bla*_{NDM-1} e *bla*_{NDM-2} em *A. baumannii* isolados da Europa foram localizados em um transposon (Tn-125). Já nos isolados da China, o gene *bla*_{NDM-1} foi localizado em plasmídeo transferível por conjugação (ZARRILLI *et al.*, 2013). O quadro 3 mostra as metalo- β -lactamases descritas em *Acinetobacter* até o momento.

Quadro 3- Metalo- β -lactamases descritas em *Acinetobacter*

Metallo-β-lactamase	Localização	Local do 1º relato
IMP-1	Integron de Classe 1	Itália, Japão, Coreia do Norte, Coreia do Sul, Índia, Brasil, Inglaterra
IMP-2	Integron de Classe 1	Itália, Japão
IMP-4	Integron de Classe 1	Singapura, Hong-Kong
IMP-5	Integron de Classe 1	Portugal
IMP-6	-	Brasil
IMP-8	-	China
IMP-11	-	Japão
IMP-19	-	Japão
VIM-1	Integron de Classe 1	Grécia
VIM-2	Integron de Classe 1	Coreia do Norte
VIM-3	Integron de Classe 1	Taiwan
VIM-4	Integron de Classe 1	Grécia
VIM-11	-	Taiwan
SIM-1	Integron de Classe 1	Coreia do Sul, China
NDM-1	Cromossomo, ISAbal25, plasmídeo	Índia, Alemanha, Argélia, Bélgica, Bangladesh, República Tcheca, China
NDM-2	Cromossomo	Egito, Israel e Emirados Árabes

Fonte: Zarrili *et al.* (2013).

2.8.2 Outros mecanismos de resistência

Os mecanismos de resistência não enzimáticos incluem: alterações nos sítios de ligação aos antibióticos, alterações nas proteínas de membrana externa, modificações na afinidade às PBPs ou expressão dessas proteínas, e à presença de bombas de efluxo (PELEG *et al.*, 2008).

Importantes surtos por *A. baumannii* resistente ao imipenem ocorrem devido à perda de porinas. Há relatos de isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos com redução na expressão de proteínas de membrana externa (*outer membrane proteins* – OMPs) de 47, 44 e 37 kDa, com aumento na expressão de AmpC. Isolados da Espanha, com perda de OMPs de

22 e 33 kDa combinada com a produção de OXA-24 resultou em resistência a carbapenêmicos. A redução na expressão de PBP2 foi descrita em isolados de *A. baumannii* da Espanha com resistência a carbapenêmicos (GIAMARELLOU *et al.*, 2008).

Diversos tipos de bombas de efluxo foram identificadas em inúmeras espécies bacterianas. Em *A. baumannii* foi caracterizada a bomba de efluxo AdeABC, responsável por resistência a aminoglicosídeos, cefotaxima, tetraciclina, eritomicina, cloranfenicol, trimetopim, e fluoroquinolonas. A superexpressão da bomba de efluxo AdeABC pode também, juntamente com as oxacilinases, conferir resistência aos carbapenêmicos (POIREL; NORDMANN, 2006).

3 JUSTIFICATIVA

O aumento da frequência de infecções hospitalares associadas a espécies de *Acinetobacter* e o rápido desenvolvimento de resistência destes organismos aos antimicrobianos vêm representando um grave problema de saúde pública. A vigilância e o controle da disseminação de cepas resistentes são necessários no ambiente hospitalar, principalmente em UTI, onde ocorrem elevados índices de resistência à terapia antimicrobiana utilizada nas infecções. O uso indiscriminado de antimicrobianos, a realização de procedimentos invasivos e a imunossupressão dos pacientes contribuem para o agravamento clínico e mortalidade.

Em virtude dos recentes surtos descritos e do aumento na prevalência global de espécies de *Acinetobacter* resistentes aos carbapenêmicos, drogas de escolha para o tratamento destas infecções, é importante a realização de estudos microbiológicos, bem como o conhecimento dos mecanismos de resistência e virulência envolvidos nestes isolados, a fim de auxiliar a implantação de medidas mais efetivas de prevenção e controle da transmissão deste patógeno nas unidades hospitalares.

A detecção de genes de virulência e resistência prevalentes, bem como a avaliação da capacidade de formação de biofilme em superfícies clinicamente relevantes, poderão fornecer dados importantes para o entendimento da dinâmica das infecções. A resistência aos carbapenêmicos associada à presença de biofilme contribui para a geração de infecções crônicas devido à dificuldade de erradicação do micro-organismo. O conhecimento dos mecanismos envolvidos no processo de resistência e virulência do patógeno pode contribuir de forma significativa na resposta terapêutica, auxiliando na implementação de estratégias visando à redução dos surtos hospitalares, diminuindo os gastos com antibióticos e, conseqüentemente, o tempo de permanência do paciente no ambiente hospitalar.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar aspectos fenotípicos e moleculares de isolados de *Acinetobacter baumannii* obtidos de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva de um hospital público da cidade do Recife.

4.2 Objetivos específicos

- a) Confirmar a identidade bacteriana;
- b) Pesquisar a presença de genes codificadores de oxacilinases e metalo- β -lactamases em isolados de *A. baumannii*;
- c) Pesquisar a presença de genes codificadores de proteínas relacionadas à produção de biofilme;
- d) Avaliar a produção fenotípica de biofilme nesses isolados.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1 Obtenção e estoque dos isolados

Foram obtidos 67 isolados do Hospital da Restauração que atende a pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) com atendimento e hospitalização de adultos e crianças em diversas clínicas e especialidades. As amostras foram coletadas de pacientes internados em UTI no período de maio a dezembro de 2012 e obtidas através de demanda espontânea. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. O estudo é do tipo observacional descritivo. As amostras foram obtidas através de demanda espontânea.

Os isolados foram cultivados de sítios diversos (Tabela 1). As amostras foram semeadas em ágar McConkey e incubadas a 37°C por 24h. Colônias isoladas foram inoculadas em meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas a 37°C durante 24 horas. Quinhentos microlitros da cultura líquida foram adicionados a 500 µL de BHI com glicerol 50%, resultando em uma concentração de 25% de glicerol. Os estoques foram armazenados em freezer a -80°C para posterior extração de DNA.

Tabela 1- Quantitativo de isolados analisados por sítios de coleta

Sítio de coleta	Número de amostras
Secreção Traqueal	35
Líquor	11
Ponta de cateter	10
Hemocultura	03
Ferida cirúrgica	02
Líquido peritoneal	02
Swab nasal	02
Swab retal	01
Urina	01
Total	67

Fonte: A autora

5.2 Identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A identificação e Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos aos isolados de *A. baumannii* foram realizadas previamente pelo laboratório do hospital, que utilizou método automatizado Vitek® 2 Compact Biomérieux. A determinação do padrão de resistência seguiu as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (2012).

5.3 Extração de DNA

O DNA dos isolados foi extraído utilizando o DNAzol ® *Reagent* – Invitrogen, de acordo com as recomendações do fabricante. A partir de uma cultura jovem (24h em meio BHI ágar) foi realizada suspensão das colônias em 100µL de TE (10:1) até atingir a concentração correspondente a 10^7 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/ml). As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 min a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Um mililitro de DNAzol foi adicionado e homogeneizado.

Foram adicionados 500µL de etanol 100% e os tubos foram delicadamente invertidos para homogeneizar. Após 3 min a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 6500 rpm por 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e 800µL de etanol 75% foram adicionados aos tubos para ressuspender o *pellet*. Após centrifugação a 14000 rpm por 5 min a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200µL de água deionizada estéril para ressuspender o *pellet*. A quantificação do material genômico foi realizada utilizando o programa NanoDrop 2000c, ThermoScientific®.

5.4 Confirmação da identidade bacteriana

O gene 16S rDNA das 67 amostras foi amplificado com os *primers* e metodologia descritos por Figueras, Guarro, e Martínez-Murcia (2000) (Tabela 5). As reações de amplificação foram preparadas em volume total de 25 µL por tubo. Foram utilizados 20ng do DNA, 200 mM de dNTPs, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada oligonucleotídeo e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Promega®). As amplificações foram realizadas em um termociclador Biometra®, programado para 30 ciclos térmicos, correspondendo cada ciclo de um minuto a 92°C, dois minutos a 55°C, três minutos a 72°C, terminando com uma etapa de alongamento final de sete minutos a 72°C.

Os amplicons do gene 16S foram submetidos à purificação (*ExoSAP-IT for PCR Product Clean-Up* (Affymetrix®), quantificação (NanoDrop 2000c, ThermoScientific®) e encaminhados para sequenciamento no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM/Fiocruz-PE, em ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®), utilizando o *BigDye Kit* (Applied Biosystems®). Os *contigs* foram formados utilizando o programa Pregap4 version1.5. O alinhamento múltiplo das regiões sequenciadas com sequências depositadas no banco de dados *GenBank* do NCBI e a construção da árvore filogenética foi realizada utilizando o programa MEGA v.6. (TAMURA *et al.*, 2013). A confirmação da identidade foi realizada no BLASTn. A árvore filogenética foi obtida utilizando o método Neighbor-Joining utilizando *bootstrap* de 1000. Na formação da árvore filogenética além das sequências analisadas neste estudo, foram utilizadas sequências do gene 16s rDNA de outras espécies de *Acinetobacter* obtidas no banco de dados *GenBank* do NCBI e uma sequência do gene 16S rDNA de *Pseudomonas aeruginosa DS10-129* foi utilizada como grupo externo.

5.5 Detecção dos genes codificadores de Oxacilinas e Metallo-β-lactamases

Nas reações de PCR para detecção dos genes codificadores de oxacilinas (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like}) foram utilizados os *primers* descritos por Woodford *et al.* (2006) e para *bla*_{OXA-143-like} os *primers* descritos por Higgings *et al.* (2009).

Para o gene *bla*_{OXA-24-like} além da utilização dos *primers* descritos na literatura, após as análises iniciais, foram desenhados novos *primers* mais externos àqueles anteriormente utilizados, na tentativa de amplificar um tamanho maior do gene. Para a realização deste desenho foi utilizado o programa Primer3-web v.0.4.0 (ROZEN; SKALETSKY, 2000).

Nas reações de PCR para detecção dos genes codificadores de metallo-β-lactamases foram utilizados os *primers* descritos por Mendes *et al.* (2007) para o genes *bla*_{VIM} e para o gene *bla*_{IMP}. Para o gene *bla*_{SPM} foram utilizados os *primers* descritos por Zavascki *et al.* (2005). Isolados de *A. baumannii* positivos para os respectivos genes foram utilizados como controle. O quadro 4 mostra os *primers* utilizados nesse estudo.

Nas reações de PCR, foram utilizados 20ng do DNA, 200 mM de dNTPs, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada oligonucleotídio e 1U de *Taq* DNA polimerase (Promega®). As amplificações foram realizadas em um termociclador Biometra® T3000, programado para 30 ciclos térmicos, correspondendo cada ciclo de um

minuto a 94°C, um minuto a 55°C, dois minutos a 72°C, terminando com uma etapa de alongamento final de seis minutos a 72°C.

Os amplicons foram submetidos à purificação (*ExoSAP-IT for PCR Product Clean-Up* (Affymetrix®), quantificação (NanoDrop 2000c, ThermoScientific®) e encaminhados para sequenciamento no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM/Fiocruz, em ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®), utilizando o *BigDye Kit* (Applied Biosystems®). Os *contigs* foram formados utilizando o programa Pregap4 version1.5 e a confirmação da identidade foi realizada no BLASTn.

Quadro 4- Sequências dos *primers* utilizados nesse estudo.

(continua)

<i>Primer</i>	Sequência Nucleotídica	Tamanho (pb)	Fonte
16S-F 16S-R	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	~1500	FIGUERAS, GUARRO e MARTÍNEZ-MURCIA (2000)
OXA-23-like-F OXA-23-like-R	5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA-3' 5'-ATTTCTGACCGCATTTCCAT-3'	501	WOODFORD <i>et al.</i> , 2006
OXA-24-like-F OXA-24-like-R	5'-GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA-3' 5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3'	246	WOODFORD <i>et al.</i> , 2006
OXA-24-like-F OXA-24-like-R	5'TTCAGCATTTCTATTCTAGTTTCTCTC-3' 5'-ATGATTCCAAGATTTTCTAGCYACT-3'	800	Este estudo
OXA-51-like-F OXA-51-like-R	5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3' 5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'	53	WOODFORD <i>et al.</i> , 2006
OXA-58-like-F OXA-58-like-R	5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG-3' 5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC-3'	599	WOODFORD <i>et al.</i> , 2006
OXA-143-like-F OXA-143-like-R	5' -AGTAACTTTCAATAATTG-3' 5'-TTGGAAAATTATATAATCCC-3'	~200	HIGGINGS <i>et al.</i> , 2009
VIM-F VIM-R	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3' 5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'	382	MENDES <i>et al.</i> , 2007
SPM-F SPM-R	5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3' 5'-TCGCCGTGTCCAGGTATAAC-3'	168	ZAVASCKI <i>et al.</i> , 2005
IMP-F IMP-R	5'-GAATAGAATGGTAACTCTC-3' 5'-CCAAACCACTAGGTTATC-3'	188	MENDES <i>et al.</i> , 2007
Bap-F Bap-R	5'-TACTTCGCTTTACGCGCTTT-3' 5'-AAAGTGCATTATGGCCTTGC-3'	600	Este estudo

Quadro 4- Sequências dos *primers* utilizados nesse estudo.

(conclusão)

<i>Primer</i>	Sequência Nucleotídica	Tamanho (38B)	Fonte
Bap2-F Bap2-R	5'-TCAAACATGAGGTGCGACA-3' 5'-AAGCGATCCGTTGTTTATGC-3'	~900	Este estudo
<i>bla</i> _{PER-1} - F <i>bla</i> _{PER-1} - R	5'-ATGAATGTCATTATAAAAAGC-3' 5'-AATTTGGGCTTAGGGCAAGAAA-3'	925	POIREL <i>et al.</i> , 2006

Fonte: A autora

5.6 Detecção dos genes relacionados à produção de biofilme

Para as reações de PCR para o gene *bla*_{PER-1}, codificador da produção de biofilme, foram utilizados os *primers* descritos por Poirel *et al.* (2006) (Quadro 4). Para o gene *bap* os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer3-web v.0.4.0 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) (Quadro 4).

Nas reações de PCR foram utilizados 20 ng do DNA, 200 mM de dNTPs, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada oligonucleotídeo e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Promega®). As amplificações foram realizadas em um termociclador Biometra® T3000, programado para 33 ciclos térmicos, correspondendo cada ciclo de um minuto a 94°C, quarenta segundos a 58°C, cinquenta segundos a 72°C, terminando com uma etapa de alongamento final de seis minutos a 72°C.

Os amplicons foram submetidos à purificação (*ExoSAP-IT For PCR Product Clean-Up* (Affymetrix®), quantificação (NanoDrop 2000c, ThermoScientific®) e encaminhados para sequenciamento no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM/Fiocruz-PE, em ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®), utilizando o *BigDye Kit* (Applied Biosystems®). Foi realizado alinhamento múltiplo das regiões sequenciadas com sequências depositadas no banco de dados *GenBank* do NCBI, utilizando o programa MEGA v.6. (TAMURA *et al.*, 2013) e a confirmação da identidade foi realizada no BLASTn.

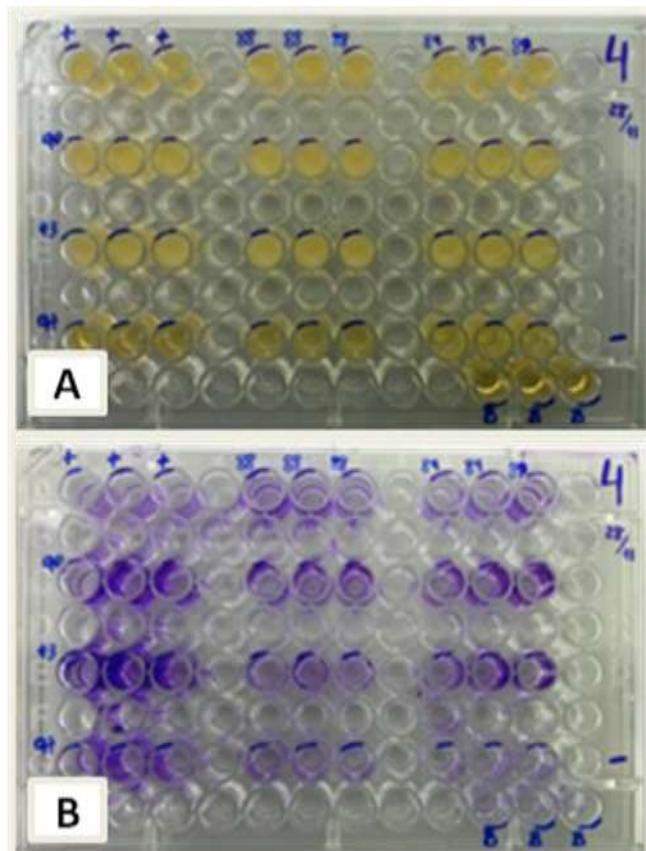
5.7 Teste fenotípico para detecção do biofilme

A avaliação da formação de biofilme foi realizada conforme procedimentos descritos por Gaddy *et al.* (2009) (figura 4). A cepa foi semeada em BHI ágar e incubada em estufa a 37°C por 24h. Colônias foram inoculadas em BHI líquido, homogeneizando bem para evitar a

formação de grumos. Posteriormente foi transferido 1 mL para cuvetas para medir a densidade óptica (DO) que variou entre 0,8 e 1 a 570 nm. Foram retirados 200 µL e inoculados em placa de poliestireno de 96 poços e cada amostra foi avaliada em triplicata. A placa foi incubada por 24h a 37°C (figura 4A) e depois, o sobrenadante retirado.

Posteriormente, realizou-se lavagem das células não aderentes com 200 µL de PBS pH 7,5 e as células aderidas foram fixadas com 20 µL de acetato de sódio 2%. A coloração foi realizada com cristal violeta 0,1% durante 1 min. Após lavagem do corante com 200 µL de água deionizada, as placas foram deixadas a temperatura ambiente até secar (figura 4B) e a densidade óptica (DO) determinada em leitor de ELISA BioRad Benchmark Plus™ (570 nm). De acordo com o valor da DO, os isolados foram classificados como: $<0,120$ = Não aderente; $0,120 > DO < 0,240$ = Moderado e $DO > 0,240$ = Aderente (formador de biofilme). Isolados de *Staphylococcus sp.* previamente testados foram utilizados como controle positivo e negativo da reação.

Figura 4- Teste fenotípico para detecção de biofilme.



Fonte: A autora

Legenda: A- Placa após incubação a 37°C por 24h.
B- Placa após lavagem do corante.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Quanto aos aspectos éticos, os isolados foram obtidos a partir de demanda espontânea com o consentimento do Hospital da Restauração através de carta de anuência. O estudo não fez referência ao paciente.

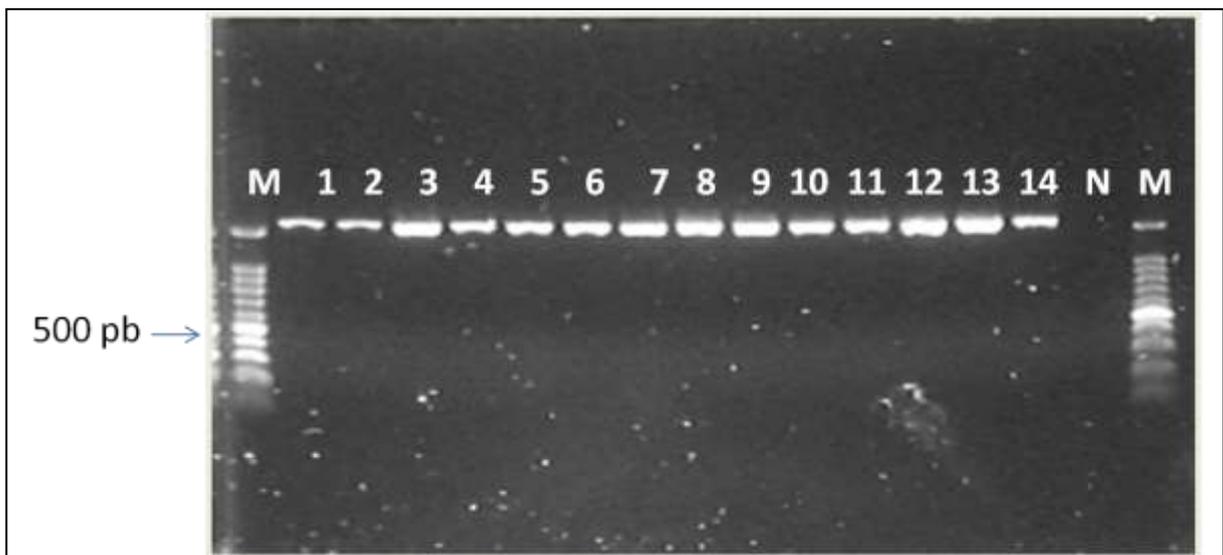
O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do CPqAM/Fiocruz sob o nº 199.770. O Comitê considerou que não há implicação ética, pois não houve envolvimento de seres humanos nos procedimentos. Concluiu que o Projeto em questão não fez uso de procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

7 RESULTADOS

Sessenta e um (91%) dos 67 isolados pesquisados apresentaram resistência aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) com CIM igual ou maior a 16 µg/mL. Seis isolados (n° 80, 112, 130, 131, 133 e 135) correspondendo a 8,9% apresentaram sensibilidade aos carbapenêmicos (Apêndice A).

O fragmento do gene 16S rDNA foi amplificado em todos os isolados. A figura 5 mostra a amplificação deste gene em 14 isolados. O produto de PCR do gene 16S rDNA foi sequenciado e em sua árvore filogenética foi obtida (figura 6), todos os isolados foram identificados como *A. baumannii* e um isolado (n°71) apesar de pertencer ao mesmo ramo monofilético, apresentou polimorfismos em sua sequência quando comparado aos demais.

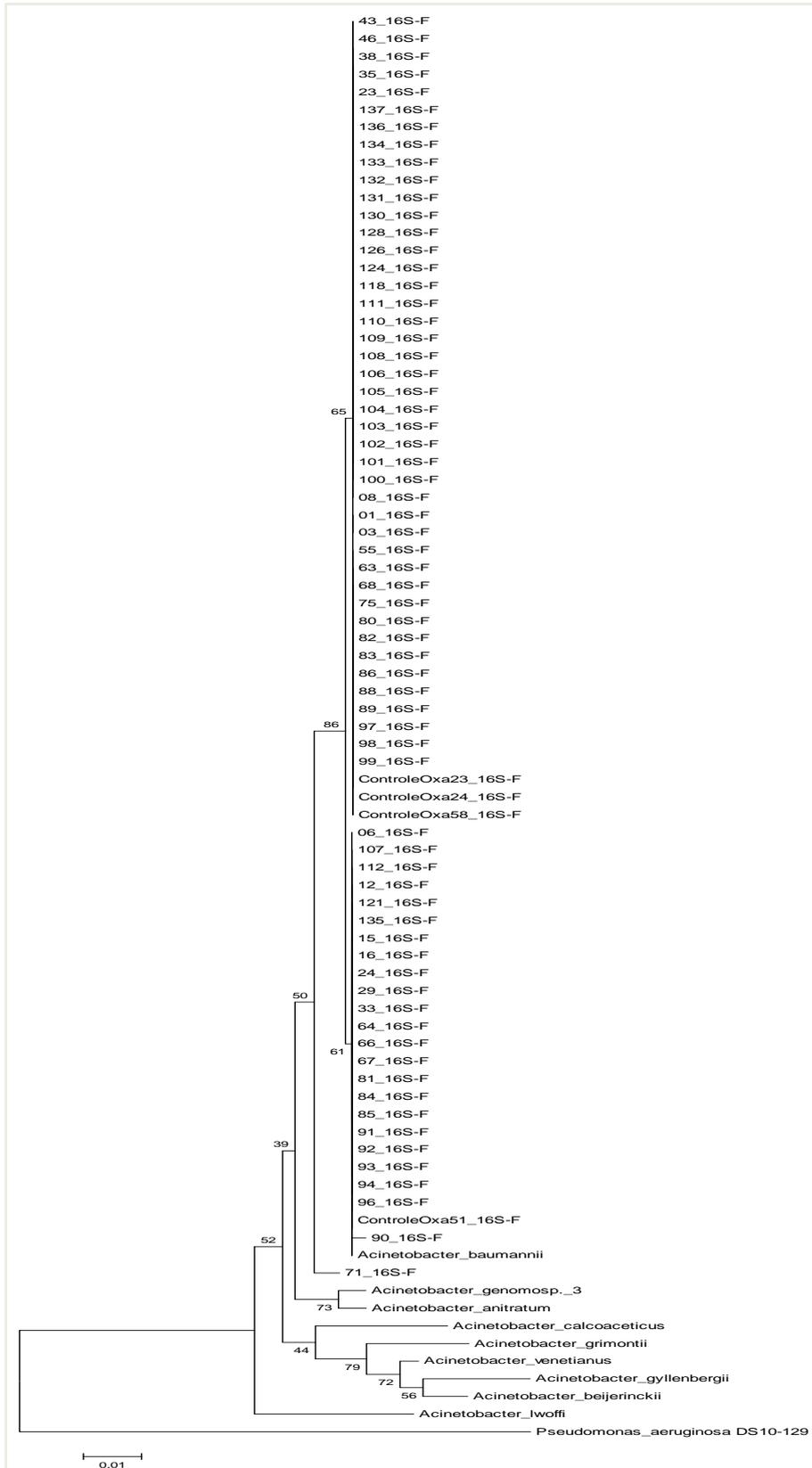
Figura 5- Produtos de PCR do gene 16S rDNA de ~1500 pb a partir do DNA total de cepas de *A. baumannii*, temperatura de pareamento 55°C.



Fonte: A autora

Legenda: Linhas: **M** = marcador de peso molecular (Ladder 100 pb), **1** = cepa de *A. baumannii* (control positivo), **2** = cepa 118, **3** = cepa 121, **4** = cepa 124, **5** = cepa 126, **6** = cepa 128, **7** = cepa 130, **8** = cepa 131, **9** = cepa 132, **10** = cepa 133, **11** = cepa 134, **12** = cepa 135, **13** = cepa 136, **14** = cepa 137, **N** = controle negativo.

Figura 6- Árvore filogenética do gene 16S rDNA construída através do programa MEGA v.6 utilizando o método Neighbor Joining.

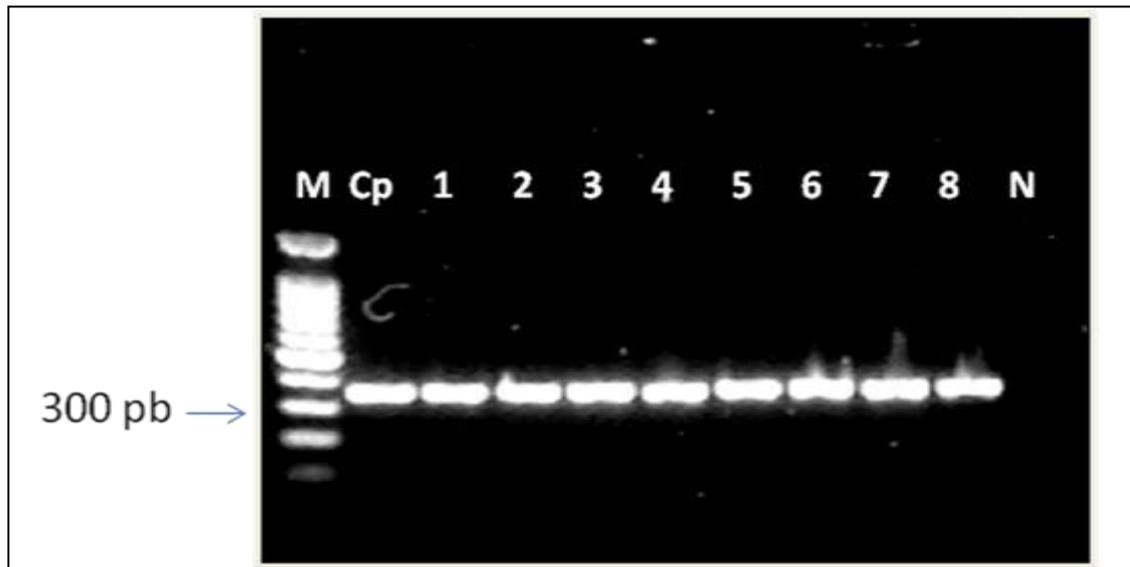


Fonte: A autora

Nota: Sequências do gene 16s rDNA de outras espécies de *Acinetobacter* foram utilizadas e o gene 16S rDNA de *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 foi utilizado como grupo externo.

Com exceção do isolado n° 71, todos os outros isolados, correspondendo a 98,5%, apresentaram o gene *bla*_{OXA-51-like}, intrínseco da espécie *A. baumannii*. A Figura 7 mostra a amplificação deste gene em oito isolados, confirmando a especificidade do gene para esta espécie.

Figura 7- Produtos de PCR do gene *bla*_{OXA-51-like} de 353 pb a partir do DNA total de cepas de *A. baumannii*, temperatura de pareamento 55°C.



Fonte: A autora

Legenda: Linhas: **M** = marcador de peso molecular (Ladder 100 pb), **Cp** = cepa de *A. baumannii* (controle positivo), **1** = cepa 130, **2** = cepa 131, **3** = cepa 132, **4** = cepa 133, **5** = cepa 134, **6** = cepa 135, **7** = cepa 136, **8** = cepa 137, **N** = controle negativo.

Dentre os 66 isolados positivos para o gene *bla*_{OXA-51-like}, 62 (93,9%) apresentaram resistência aos carbapenêmicos e 4 (6%) sensibilidade. Em relação ao sítio de coleta, 34 isolados foram provenientes de secreção traqueal, 11 isolados de LCR, 10 de cateter, 3 de hemocultura, 2 de secreção de ferida cirúrgica, 2 swab nasal, 1 de swab retal e 1 de urina (Apêndice A).

O gene *bla*_{OXA-23-like} foi amplificado em 12 isolados (17,9%). A figura 8 mostra a amplificação deste gene em cinco isolados. Destes, 11 (91,6%) apresentaram resistência aos carbapenêmicos e 1 (8,3%) apresentou sensibilidade. Em relação aos sítios de coleta, observamos que 7 isolados foram provenientes de secreção traqueal, 1 de LCR, 1 de hemocultura, 1 de urina, 1 de swab retal e 1 de swab nasal (Apêndice A).

Os produtos de amplificação para os genes *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-23-like} foram sequenciados. O alinhamento local das regiões sequenciadas com as sequências depositadas

no banco de dados *GenBank* do NCBI apresentou 96 e 97% de identidade respectivamente com o gene *bla*_{OXA-51-like} e o gene *bla*_{OXA-23-like}.

Figura 8- Produtos de PCR do gene *bla*_{OXA-23-like} de 501 pb a partir do DNA total de cepas de *A. baumannii*, temperatura de pareamento 55°C.

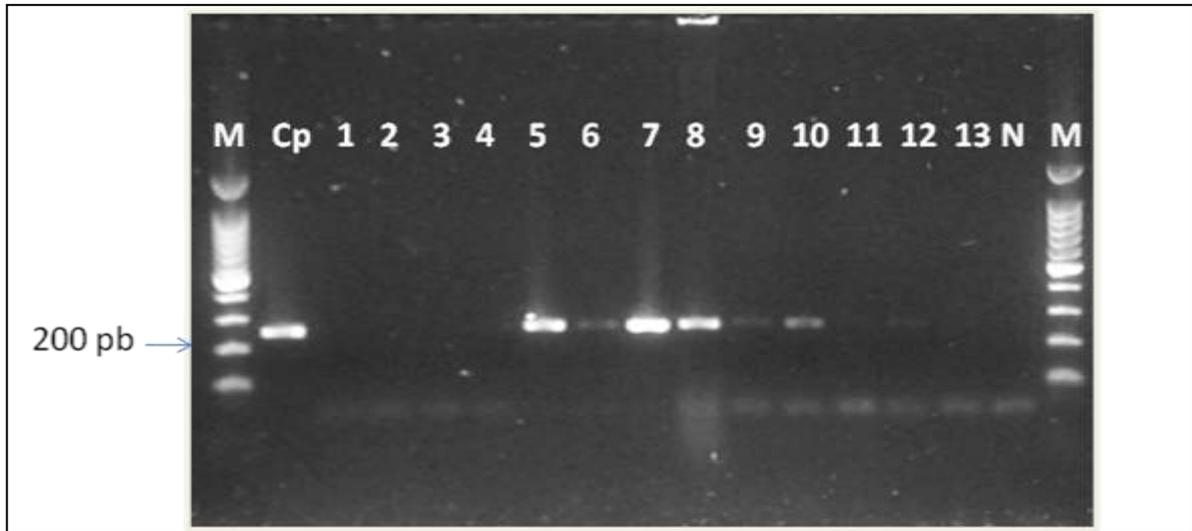


Fonte: A autora

Legenda: Linhas: **M** = marcador de peso molecular (Ladder 100 pb), **CP** = cepa de *A. baumannii* (controle positivo), **1** = cepa 01, **2** = cepa 03, **3** = cepa 06, **4** = cepa 08, **5** = cepa 12, **6** = cepa 15, **7** = cepa 16, **8** = cepa 23, **9** = cepa 24, **10** = cepa 29, **N** = controle negativo.

O gene *bla*_{OXA-24-like} foi verificado em 10 isolados (14,9%), todos resistentes aos carbapenêmicos. Em relação ao sítio de coleta observamos que 6 isolados foram obtidos de secreção traqueal, 2 de LCR, 1 de secreção de ferida cirúrgica e 1 de cateter (Apêndice A). A figura 9 mostra a amplificação deste gene em cinco isolados.

Figura 9- Produtos de PCR do gene *bla*_{OXA-24-like} de 246pb a partir do DNA total de cepas de *A. baumannii*, temperatura de pareamento 55°C.



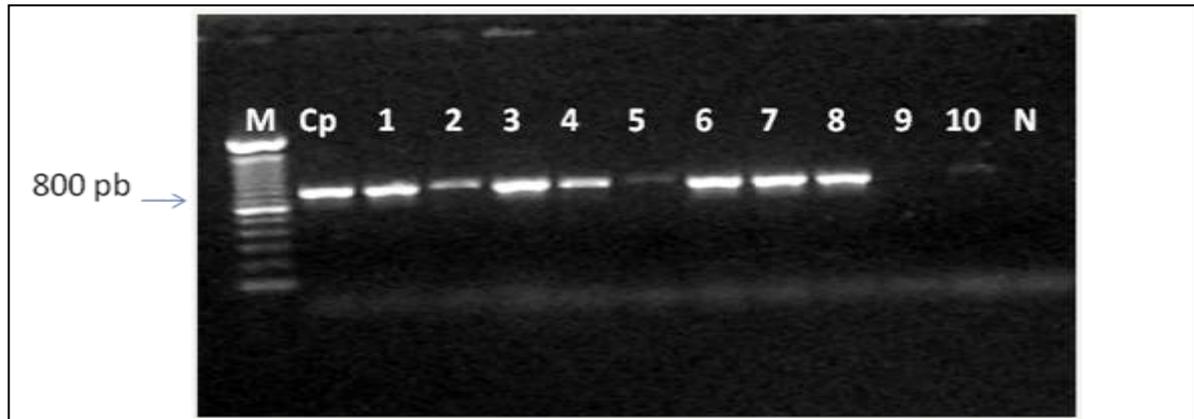
Fonte: A autora

Legenda: Linhas: **M** = marcador de peso molecular (Ladder 100 pb), **Cp** = cepa de *A. baumannii* (controle positivo), **1** = cepa 33, **2** = cepa 35, **3** = cepa 38, **4** = cepa 43, **5** = cepa 46, **6** = cepa 55, **7** = cepa 63, **8** = cepa 64, **9** = cepa 66, **10** = cepa 67, **11** = cepa 68, **12** = cepa 71, **13** = cepa 75, **N** = controle negativo.

O alinhamento local das regiões sequenciadas com as sequências depositadas no banco de dados *GenBank* do NCBI apresentou 100% de identidade com o gene *bla*_{OXA-24-like}, porém os genes que fazem parte deste grupo (*bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-25}, *bla*_{OXA-26}, *bla*_{OXA-40} e *bla*_{OXA-72}) apresentam alta similaridade, não sendo possível com a utilização destes *primers*, confirmar a identidade do fragmento encontrado. A partir desse resultado inicial, foram desenhados *primers* mais externos que contemplassem uma região maior do gene *bla*_{OXA-24}.

Na reação utilizando os *primers* mais externos o produto de PCR foi sequenciado e observou-se que o fragmento de amplificação correspondia ao gene *bla*_{OXA-72} com 100% de identidade, pertencente ao *cluster* do gene *bla*_{OXA-24-like}. A figura 10 mostra esta amplificação em 10 isolados.

Figura 10- Produtos de PCR do gene *bla*_{OXA-24-like} de 800 pb a partir do DNA total de cepas de *A. baumannii*, temperatura de pareamento 55°C.



Fonte: A autora

Legenda: Linhas: **M** = marcador de peso molecular (Ladder 100 pb), **CP** = cepa de *A. baumannii* (controle positivo), **1** = cepa 46, **2** = cepa 55, **3** = cepa 63, **4** = cepa 64, **5** = cepa 67, **6** = cepa 100, **7** = cepa 106, **8** = cepa 108, **9** = cepa 109, **10** = cepa 110, **N** = controle negativo.

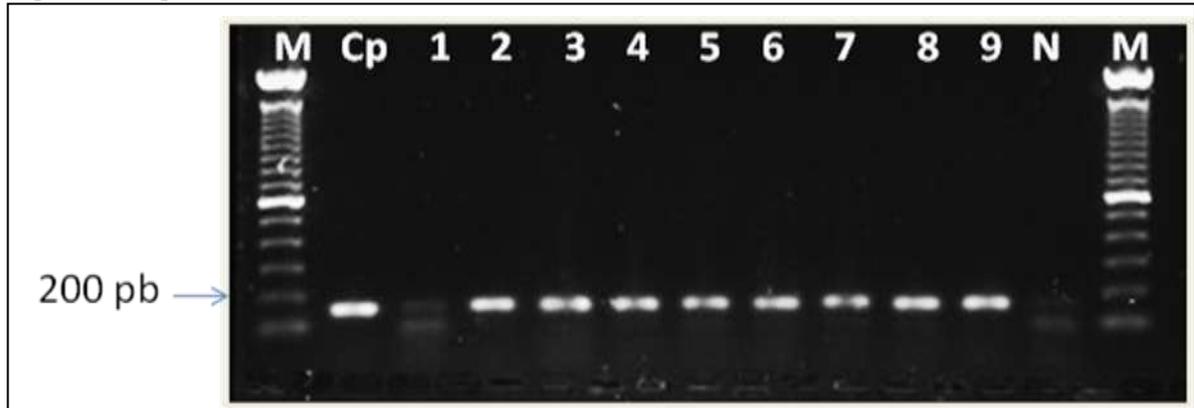
O gene *bla*_{OXA-143-like} foi encontrado em 34 isolados (50,7%). Destes, 33 (97%) apresentaram resistência aos carbapenêmicos e 1 (2,9%) apresentou sensibilidade. Em relação ao sítio de coleta, 18 isolados foram obtidos de secreção traqueal, 6 de LCR, 4 de cateter, 2 de líquido peritoneal, 2 de hemocultura, 1 de secreção de ferida cirúrgica e 1 de swab nasal (Apêndice A). A figura 11 mostra a amplificação do gene *bla*_{OXA-143} em 8 isolados.

A análise do fragmento de aproximadamente 200 pb no banco de dados do NCBI dos 34 isolados mostrou identidade de 98% com o *cluster* do gene *bla*_{OXA-143} e *bla*_{OXA-231}, impossibilitando a diferenciação entre ambos.

Fazendo uma análise comparativa entre a presença dos genes codificadores de oxacilinas presentes neste estudo, observamos que em alguns isolados além de possuírem o gene *bla*_{OXA-51-like} intrínseco, também apresentaram simultaneamente dois genes pesquisados. Dentre os isolados positivos para o gene *bla*_{OXA-23-like}, 1 isolado (n°8) apresentou simultaneamente a presença do gene *bla*_{OXA-143-like}. Nos isolados positivos para o gene *bla*_{OXA-24-like}, 4 isolados (n°64, 67, 109 e 110) também apresentaram simultaneamente a presença do gene *bla*_{OXA-143-like} (Apêndice A).

O gene *bla*_{OXA-58-like} e os genes codificadores de metalo-β-lactamase (*bla*_{VIM}, *bla*_{SPM} e *bla*_{IMP}) não foram encontrados neste estudo.

Figura 11- Produtos de PCR do gene *bla*_{OXA-143-like} de ~200 pb a partir do DNA total de cepas de *A. baumannii*, temperatura de pareamento 55°C.



Fonte: A autora

Legenda: Linhas: **M** = marcador de peso molecular (Ladder 100 pb), **Cp** = cepa de *A. baumannii* (controle positivo), **1** = cepa 12, **2** = cepa 16, **3** = cepa 23, **4** = cepa 24, **5** = cepa 35, **6** = cepa 67, **7** = cepa 68, **8** = cepa 75, **9** = cepa 81, **N** = controle negativo.

Em relação ao teste fenotípico para avaliar a formação de biofilme foi observada aderência em 16 isolados (23,8%) ($DO > 0,240$); em 21 isolados (31,3%) a aderência foi considerada moderada ($0,120 > DO < 0,240$) e em 30 isolados (44,7%) não houve aderência ($DO < 0,12$). Dentre os 16 isolados aderentes, 15 (93,7%) dos isolados apresentaram resistência aos carbapenêmicos. Em relação ao sítio de coleta, 9 isolados foram obtidos de secreção traqueal, 3 de LCR, 1 de hemocultura, 1 de urina, 1 de ferida cirúrgica e 1 de swab nasal. Já em relação a presença dos genes codificadores de oxacilinas observamos em 8 isolados o gene *bla*_{OXA-23-like} e em 8 o gene *bla*_{OXA-143-like}, nestes, 1 isolado (n°8) apresentou simultaneamente os genes *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like} e *bla*_{OXA-143-like} (Apêndice A).

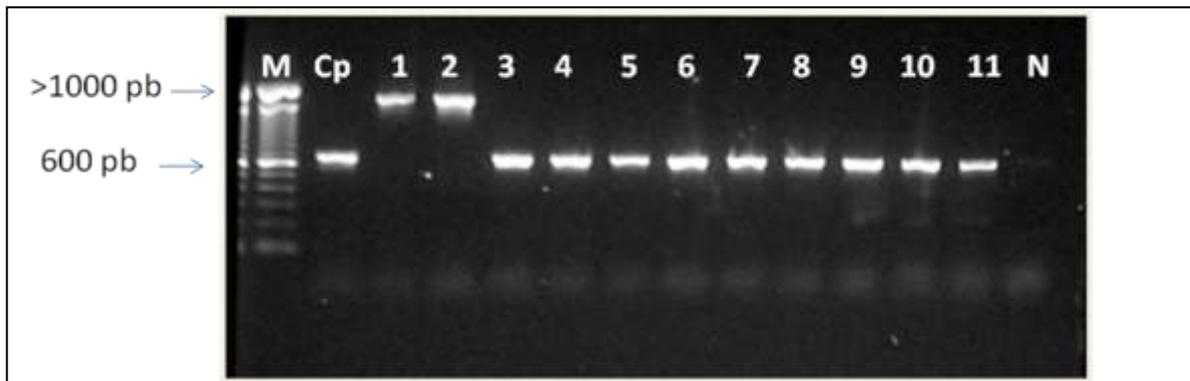
Em relação aos 21 isolados que possuem aderência moderada, foi observado resistência aos carbapenêmicos em 17 isolados (80,9%). Em relação ao sítio de coleta foi observado que 11 isolados foram obtidos de secreção traqueal, 5 de cateter, 4 de LCR e 1 de líquido peritoneal. Dentre o total de isolados, apenas 1 (n°71) não possui o gene *bla*_{OXA-51-like}, 1 isolado (n°93) possui simultaneamente os genes *bla*_{OXA-23-like} e *bla*_{OXA-51-like}; 3 isolados (n°67, 108, 110) apresentaram o gene *bla*_{OXA-24-like} e *bla*_{OXA-51-like}, 13 isolados também possuem os genes *bla*_{OXA-143-like} sendo os isolados (n° 67 e 110) o gene *bla*_{OXA-24-like} (Apêndice A).

Já nos 30 isolados que não foi observado aderência, 29 (96,6%) dos isolados apresentaram resistência aos carbapenêmicos. Em relação aos sítios de coleta, 15 isolados foram obtidos de secreção traqueal, 5 de cateter, 4 de LCR, 2 de hemocultura, 1 de líquido peritoneal, 1 de ferida cirúrgica, 1 de swab nasal e 1 de swab retal. Quanto a presença dos genes de oxacilinas foi observado em 3 isolados (n° 33, 66, 96) o gene *bla*_{OXA-23-like}, 7

isolados foram positivos para o gene *bla*_{OXA-24-like}, 13 isolados possuem o gene *bla*_{OXA-143-like}, destes os isolados n° 64 e 109 apresentaram também o gene *bla*_{OXA-24-like} (Apêndice A).

O gene *bap*, responsável pelo amadurecimento e manutenção do biofilme sobre superfícies, foi pesquisado nos 67 isolados. Foi observada positividade em 58 (86,5%), destes 40 (68,9%) apresentaram amplificação do tamanho esperado (600pb) e 18 (31%) apresentaram amplificação de fragmento maior que 1000pb (Apêndice A). A figura 12 representa a amplificação de 600 pb em 9 isolados e a amplificação > 1000pb em 2 isolados.

Figura 12- Produtos de PCR do gene *bap* a partir do DNA total de cepas de *A. baumannii*, temperatura de pareamento 58°C.



Fonte: A autora

Legenda: Linhas: **M** = marcador de peso molecular (Ladder 100 pb), **CP** = cepa de *A. baumannii* (controle positivo), **1** = cepa 01, **2** = cepa 03, **3** = cepa 06, **4** = cepa 08, **5** = cepa 12, **6** = cepa 15, **7** = cepa 16, **8** = cepa 23, **9** = cepa 24, **10** = cepa 29, **11** = cepa 33, **N** = controle negativo.

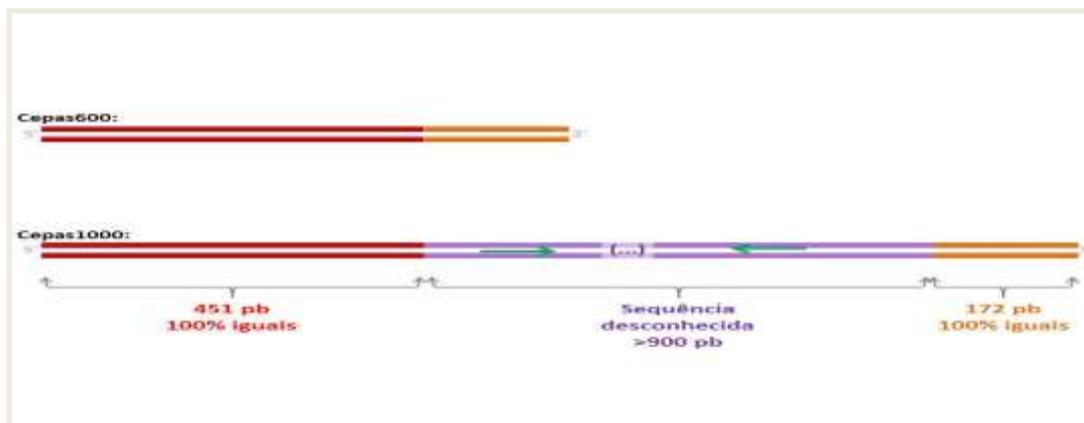
O fragmento de amplificação de 600 pb do gene *bap* foi sequenciado utilizando os mesmos *primers* usados na reação de PCR. O alinhamento local das regiões sequenciadas com as sequências depositadas no banco de dados *GenBank* do NCBI apresentou 100% de identidade com o gene *bap*.

Dentre os 40 isolados que apresentaram o produto de amplificação de 600pb, 36 (90%) apresentaram resistência aos carbapenêmicos. Em relação ao sítio de coleta, 17 isolados foram obtidos de secreção traqueal, 9 de LCR, 6 de cateter, 2 de hemocultura, 2 de swab nasal, 1 de urina, 1 de ferida cirúrgica, 1 de líquido peritoneal e 1 de swab retal.

Fazendo um comparativo com a presença de genes codificadores de oxacilinas, foi observado a presença do gene *bla*_{OXA-23-like} em 12 isolados, o gene *bla*_{OXA-24-like} está presente em 3 isolados, o gene *bla*_{OXA-51-like} em todos os isolados e o gene *bla*_{OXA-143-like} em 19 isolados. Relacionando a presença do gene *bap* e a produção de biofilme no teste fenotípico observamos que 13 (32,5%) dos isolados apresentaram aderência, 13 (32,5%) apresentaram aderência moderada e 14 (35%) não apresentaram aderência (Apêndice A).

O fragmento de amplificação de > 1000pb também foi sequenciado utilizando os *primers* Bap. Na análise do sequenciamento verificamos que o início e o final da sequência apresentavam 100% de identidade com o gene *bap*, porém nossa análise não contemplava a sequência de > 900 pb que estava presente na região central (figura 13).

Figura 13- Localização dos *primers* *bap* 2 (setas em verde) que contemplam a região central dos isolados com amplificação de fragmento >1000 pb do gene *bap*



Fonte: A autora

Após a análise do sequenciamento observamos que o início (451pb iniciais) e o final (172 pb terminais) da sequência corresponderam ao gene *bap* com 100% de identidade e a região central correspondeu ao gene *dacD*, que na espécie *A.baumannii*, está relacionado a maturação e formação do peptidoglicano (CAYÔ *et al.*, 2011), interrompido pelo elemento de inserção ISAb125 (codificador de transposase).

Todos os 18 isolados que apresentaram o produto de amplificação >1000pb são resistentes aos carbapenêmicos. Em relação ao sítio de coleta, 12 isolados foram obtidos de secreção traqueal, 4 de cateter, 1 de LCR e 1 de líquido peritoneal. Fazendo comparativo com os genes codificadores de oxacilinases, observamos que nenhum isolado foi positivo para o gene *bla*_{OXA-23-like}, o gene *bla*_{OXA-24-like} está presente em 2 isolados e em 13 isolados o gene *bla*_{OXA-143-like} foi encontrado (Apêndice A). Dentre os isolados que apresentaram esta inserção, 10 (55,5%) dos isolados não formaram aderência no teste fenotípico que avaliou a formação de biofilme, 2 (11,1%) foram considerados aderentes e 6 (33,3%) dos isolados apresentaram aderência moderada.

Alguns isolados provenientes dos mesmos pacientes apresentaram diferenças na presença do gene *bap* e/ou no teste fenotípico que avaliou a formação de biofilme (quadro 5).

Quadro 5- Isolados provenientes dos mesmos pacientes que apresentaram diferenças na presença do gene *bap* e produção de biofilme em teste fenotípico.

Paciente	Nº do isolado	Sítio de coleta	Produto de amplificação 600pb	Produto de amplificação de >1000pb	Teste fenotípico Biofilme
A	29	Secreção traqueal	+	-	Aderente
	33	Swab retal	+	-	Não aderente
B	38	Ponta cateter	+	-	Não aderente
	85	Líquor	-	+	Não aderente
	92	Líquor	+	-	Não aderente
C	94	Secreção Traqueal	+	-	Aderente
	96	Hemocultura	+	-	Não aderente
D	99	Secreção traqueal	-	+	Não aderente
	103	Ponta cateter	-	+	Aderente
E	104	Líquido peritoneal	-	+	Moderado
	108	Secreção traqueal	+	-	Moderado
F	136	Ponta cateter	-	+	Não aderente
	137	Ponta cateter	+	-	Moderado

Fonte: A autora

Esses resultados foram repetidos e confirmados. O gene *bla_{PER-1}* também relacionado a produção de biofilme não foi encontrado em nenhum dos isolados analisados.

8 DISCUSSÃO

Cerca de metade dos isolados analisados nesse estudo foi obtida de cultura de secreção traqueal (52,2%) e maior parte apresentou resistência aos carbapenêmicos (91%) com CIM ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$, drogas de escolha no tratamento de infecções causadas por micro-organismos resistentes. Segundo Munoz-Price *et al.* (2008), o aumento da resistência aos carbapenêmicos em isolados de *A. baumannii* pode estar relacionado a utilização prévia de aminoglicosídeos, cefalosporinas e quinolonas de largo espectro, antibióticos utilizados com frequência na rotina hospitalar que podem levar a seleção de cepas resistentes. De acordo com o autor, além da antibioticoterapia prévia, o uso de ventilação mecânica também é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de infecção, devido à capacidade de aderência ao epitélio que o micro-organismo apresenta, tornando o trato respiratório a fonte mais frequentemente de isolamento do patógeno que pode estar presente colonizando o paciente ou causando infecção.

As amostras foram identificadas previamente no laboratório do hospital que utilizou automação Vitek® 2 Compact BiomeriêuX, porém o banco de dados do programa do equipamento é limitado e os substratos (açúcares e enzimas) não são específicos para a espécie *A. baumannii*. Devido a esta limitação na identificação bacteriana, utilizamos o sequenciamento do gene 16S rDNA para confirmação da identificação da espécie, uma vez que esse gene apresenta-se conservado entre as espécies e é utilizado para esta análise (ALMEIDA; ARAÚJO, 2013). Todos os isolados foram identificados como *A. baumannii*, inclusive o isolado n°71 que não apresentou o gene intrínseco da espécie (*bla*_{OXA-51-like}). Este isolado apresentou polimorfismos em sua sequência e agrupou-se no mesmo ramo monofilético na árvore filogenética, entretanto localizou-se à parte dos demais, sugerindo que a identificação apenas utilizando o gene de resistência *bla*_{OXA-51-like} pode apresentar falhas, visto que genes de resistência tendem a sofrer pressões seletivas. Uma análise do sequenciamento completo do gene 16S rDNA, bem como do genoma do isolado poderá esclarecer possíveis dúvidas quanto a identidade da espécie. Em estudo realizado por Jawad *et al.* (1998) foi observado que a espécie *A. baumannii* está mais presente em unidades hospitalares devido a sua capacidade de sobrevivência no ambiente quando comparada a outras espécies como *A. johnsonii*, *A. junii* e *A. lwoffii*, as quais raramente tem sido relatadas em infecção nosocomial. Esta capacidade de sobrevivência no ambiente hospitalar está associada ao aumento da transmissibilidade do patógeno e a manutenção dos surtos.

Vários mecanismos diferentes de resistência aos antimicrobianos foram descritos para o gênero *Acinetobacter*, porém em relação à resistência aos carbapenêmicos pela espécie *A.*

baumannii, observa-se que é mais comumente mediada por oxacilinasés do que por metalo- β -lactamases (OPAZO *et al.*, 2012). Os isolados utilizados neste estudo confirmaram o que já é descrito na literatura, pois não foram encontrados os genes codificadores de metalo- β -lactamases (*spm*, *vim* e *imp*), enquanto alguns genes codificadores de oxacilinasés estão presentes.

A presença do gene *bla*_{OXA-51-like} intrínseco da espécie, foi encontrado em todos os isolados analisados nesse estudo com exceção do isolado n°71. Este achado também contribuiu para confirmar a identificação da espécie realizada previamente utilizando o gene 16S rDNA. A análise do sequenciamento do gene *bla*_{OXA-51-like} apresentou polimorfismos, estes já descritos na literatura como marcadores importantes para análise filogenética apresentando potencial para contribuir na identificação dos clones europeus I, II e III e demais linhagens clonais (ZANDER *et al.*, 2013).

A carbapenemase OXA-23 tem se mostrado geneticamente relacionada com a resistência a carbapenêmicos isolados do Brasil, não havendo conhecimento dos mecanismos específicos envolvidos na resistência (GALES *et al.*, 2003). Em relação aos 12 isolados deste estudo que apresentaram amplificação do gene *bla*_{OXA-23-like}, foi observado que estes apresentaram resistência aos carbapenêmicos, porém uma cepa apresentou sensibilidade diferentemente do estudo realizado por Dalla-Costa *et al.* (2003) que analisou 11 isolados onde foi descrita a presença da enzima OXA-23 e do gene *bla*_{OXA-23-like} em 8 isolados e todos apresentaram resistência aos carbapenêmicos.

Nesse estudo observou-se também a presença do gene *bla*_{OXA-72}, pertencente ao *cluster bla*_{OXA24-like}. A confirmação de sua identidade se deu após a utilização de *primers* mais externos à sequência encontrada inicialmente. Estes *primers* externos foram desenhados devido aos genes pertencentes a este *cluster* diferirem entre si em apenas 1 a 5 aminoácidos, impossibilitando a confirmação da sua identidade de forma precisa. Este gene já foi encontrado em São Paulo em estudo realizado por Werneck *et al.* (2011) e recentemente no Recife (SÁ CAVALCANTI *et al.*, 2013), sendo observada relação clonal entre os isolados encontrados e os isolados provenientes de São Paulo, sugerindo a possibilidade de disseminação clonal no país.

Dentre os genes codificadores de oxacilinasés pesquisados neste estudo o gene *bla*_{OXA-143-like} apresentou-se em maior número, 34 isolados correspondendo a 50,7% dos isolados analisados. Estudos multicêntricos em hospitais públicos brasileiros do estado de Minas Gerais e São Paulo também apresentaram alta prevalência deste gene, bem como no estado do Paraná e Rio de Janeiro, indicando uma possível endemicidade no país (ANTONIO *et al.*,

2011; WERNECK *et al.*, 2011). Um isolado (n°112) obtido de secreção traqueal apresentou sensibilidade aos carbapenêmicos, indicando que o mecanismo de resistência pode não estar sendo expresso.

A diferença entre os genes *bla*_{OXA-143} e *bla*_{OXA-231} encontra-se na posição 671, onde o gene *bla*_{OXA-143} possui uma adenina e o gene *bla*_{OXA-231} uma citosina. Essa alteração modifica um aminoácido que na sequência OXA-143 é o aspartato e na sequência OXA-231 é a alanina (ZARRILLI *et al.*, 2013). Como os *primers* utilizados para o gene *bla*_{OXA-143} abrangem a região da sequência entre a posição 402 até a posição 523, não foi possível identificar qual destes genes está presente nos isolados do presente estudo.

Além da análise molecular da resistência, também foi avaliada a capacidade de formação de biofilme dos isolados. Em 55,2% dos isolados analisados encontramos aderência forte e aderência moderada, indicando que a formação de biofilme nestes isolados é um fator agravante que pode contribuir para manutenção das infecções, dificultando o tratamento. Em estudo realizado por Mohamed e Huang (2007) foi observado que um biofilme bacteriano pode tolerar concentrações elevadas de antibióticos na ordem de 10 a 100 vezes maior que as doses utilizadas rotineiramente.

Em relação à análise molecular envolvida na formação do biofilme, neste estudo foi observada a presença do gene *bap* em 86,5% dos isolados analisados. Destes, 18 (31%) dos isolados apresentaram a inserção de ISAba125/*dacD*. Esta inserção sugere que houve uma alteração na expressão do gene *bap*, o qual pode ter dificultado o amadurecimento e manutenção do biofilme, uma vez que em 10 (55,5%) destes isolados não houve formação de biofilme no teste fenotípico. Porém, a regulação na formação do biofilme é multifatorial e pode estar não apenas relacionada a presença, ausência ou alteração das funções codificadas pelo gene *bap*. Fatores como a presença de *pili*, proteínas de membrana externa (OmpA) e proteínas relacionadas a adesinas, as quais facilitam a adesão e invasão bacteriana em células hospedeiras, também podem estar envolvidos (GADDY; ACTIS, 2009). Embora tenha sido observada a capacidade de formar biofilme em superfícies abióticas pela espécie *A. baumannii*, muitos mecanismos moleculares e fenotípicos relacionados a esse processo ainda não foram elucidados (GADDY; ACTIS, 2009).

Em alguns isolados provenientes de um mesmo paciente (quadro 5), observamos diferenças quanto à presença ou ausência de inserção no gene *bap* e aderência no teste fenotípico que avaliou a produção de biofilme, sugerindo a presença de uma população bacteriana mista proveniente de fontes múltiplas de infecção e/ou colonização. Estudos que avaliem o perfil clonal destes isolados, como o sequenciamento do gene *bla*_{OXA-51}, PFGE e

MLST podem indicar o grau de similaridade entre as amostras e fornecer melhores esclarecimentos quanto aos resultados observados.

9 CONCLUSÕES

- a) Neste estudo observou-se que o gene *bla*_{OXA-143-like} foi o mais frequente nos isolados,
- b) Dentre os demais genes codificadores de oxacilinases pesquisados, os genes *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like} e o *bla*_{OXA-72} também foram encontrados em alguns isolados de *A. baumannii*, sendo o *bla*_{OXA-23-like} o mais frequente, uma vez que o gene *bla*_{OXA-51-like} é intrínseco da espécie,
- c) A ausência do gene *bla*_{OXA-51-like} no isolado n°71 pode indicar que este gene não é adequado como marcador para identificação da espécie *A. baumannii*, apesar de ser utilizado pela comunidade científica,
- d) A maioria dos isolados analisados possui capacidade de formar biofilme e possui o gene *bap*, responsável pelo amadurecimento e manutenção do biofilme em superfícies,
- e) Alguns isolados positivos para o gene *bap*, apresentaram inserção do ISAbal25/*dacD* em sua sequência, e em sua maioria, foi observado diminuição da aderência bacteriana no teste fenotípico, indicando que houve alteração na expressão deste gene.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, D. M.; HARTMAN, B. J. *Acinetobacter species*. In: MANDELL, G.L.; BENNET, J.E.; DOLIN, R. (Ed.) **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2010. p. 2881-2885.
- ALMEIDA, L. A.; ARAÚJO, R. Highlights on molecular identification of closely related species. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 13, p. 67-75, Jan. 2013.
- AMBLER, R.P. The Structure of Beta-Lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 289, p. 321-331, May 1980.
- ANTONIO, C. S. *et al.* High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the blaOXA-143 gene in Brazilian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 3, p. 1322–1323, Mar. 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Módulo V. Brasília, DF, 2004.
- ANANDHAM, R. *et al.* *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. **Journal of Microbiology**, Korea, v. 48, n. 1, p. 36-39, Feb. 2010.
- BAUMANN, P. *et al.* Oxidase-negative species (genus *Acinetobacter*). **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 95, n. 5, p. 1520-1541, May.1968.
- BEIJERINCK, M. Pigmenten als oxy datie producten geviormd door bacterien. **Versl Koninklijke Akad**, Amsterdam, v. 19, p.1092-1103, Jan. 1911.
- BOU, G. *et al.* OXA-24 , a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Whashington, v. 44, n. 6, p. 1556-1561, Jun. 2000.
- BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Paris, v. 240, n. 3, p. 228–240, Apr. 1986.
- BROSSARD, K. A.; CAMPAGNARI, A. A. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. **Infection and Immunity**, New York, v. 80, p. 228-233, Jan. 2012.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A Functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, Jun. 1995.
- BRISOU, J.; PRÉVOT, A. R. Études de systématique bactérienne. X. Révision des espèces réunies dans le genre *Achromobacter*. **Annales de l'Institut Pasteur**, Paris, v. 86, p. 722-728, Jan. 1954.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, (Estados Unidos). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing** Wayne, PA, 2012. (CLSI document M100-S22).

CARR, E. L. *et al.* Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 53, n. 4, p. 953-963, Jul. 2003.

CARNEIRO, M.; SARIDAKIS, H. O. Pneumonia associada à ventilação mecânica por *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenem. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 28–33, Apr. 2008.

CARVALHO, K. R. *et al.* Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 25-28, Jul. 2009.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla* GIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 12, p. 4654–4661, Dec. 2004.

CAYÔ, R. *et al.* Analysis of genes encoding penicillin-binding proteins in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 12, p. 5907–5913, Dez. 2011.

COELHO, J. M. *et al.* Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3623–3627, Oct. 2006.

CONEJO, A. D. E. *et al.* Evaluation of the VITEK 2 System for the identification and susceptibility testing of three species of nonfermenting Gram-negative rods frequently isolated from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 9, p. 3247–3253, Sep. 2001.

DALLA-COSTA, M. L. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 7, p. 3403–3406, Jul. 2003.

DIJKSHOORN, L. *et al.* An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature reviews. Microbiology**, London, v. 5, n. 12, p. 939–951, Dec. 2007.

FIGUERAS, M. J.; GUARRO, J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. Use of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified 16S rRNA gene for the identification of *Aeromonas* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 2023–2025, May. 2000.

FOURNIER, P. E., *et al.* Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS genetics**, San Francisco, v. 2, n. 1, p. 1-7, Jan. 2006.

GADDY, A. J., ACTIS, A. L.; Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiol**, Miami, v. 4, n. 4, p. 273-278, Apr. 2009.

GADDY, J. A. *et al.* The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 77, n. 8, p. 3150-3160, May. 2009.

GALES, A. C. *et al.* Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 45, n. 1, p. 77-79, Jan. 2003.

GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clinical infectious diseases**, Oxford, v. 41, n. 6, p. 848–854, Sep. 2005.

GIAMARELLOU, H. *et al.* *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 106–119, Aug. 2008.

GIONCO *et al.* Detection of OXA-231, a new variant of blaOXA-143, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 67, n. 10, p. 2531-2532, Oct. 2012.

GO *et al.* Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. **Lancet**, London, v. 344, n. 8933, p. 1329-1332, Nov. 1994.

HIGGINS, P. G. *et al.* OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 12, p. 5035–5038, Dec. 2009.

HOBAN, D. J. *et al.* In vitro activity of tigecycline against 6792 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the global Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program, 2004). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 52, n. 3, p. 215–217, Jul. 2005.

HOWARD, A. *et al.* *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, Georgetown, v. 3, n. 3, p. 243–250, May. 2012.

IACONO, M. *et al.* Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 7, p. 2616–2625, Jul. 2008.

IMPERI, F. *et al.* The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. **IUBMB life**, London, v. 63, n. 12, p. 1068–1074, Dec. 2011.

JAWAD, A. *et al.* Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 7, p. 29–33, Jul. 1998.

JIN, W. *et al.* Comparative study of the inhibition of metallo-beta-lactamases (IMP-1 and VIM-2) by thiol compounds that contain a hydrophobic group. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 27, n. 6, p. 851–856, Jun. 2004.

JOLY-GUILLOU, M.-L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clinical microbiology and infection**, Oxford, v. 11, n. 11, p. 868–873, Nov. 2005.

JONES, R. N. *et al.* Multicenter studies of tigecycline disk diffusion susceptibility results for *Acinetobacter spp.* **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 1, p. 227–230, Jan. 2007.

KEMPFE, M. *et al.* Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 105–114, Feb. 2012.

KIM, D. *et al.* *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ames, v. 59, n. 4, p. 1555–1556, Jan. 2009.

KOELEMAN, J. G. M. *et al.* Antibiotic resistance is a major risk factor for epidemic behavior of *Acinetobacter baumannii*. **Infectious Control Hospital Epidemiology**, Chicago, v. 22, n. 5, p. 284–288, May. 2001.

LASA, I.; PENADÉS, J. R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, n. 2, p. 99–107, Mar. 2006.

LEE, H.-W. *et al.* Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical microbiology and infection**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 49–54, Jan. 2008.

LEE, K. *et al.* Novel acquired metallo- β -lactamase gene, bla SIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* vlinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 11, p. 4485–4491, Nov. 2005.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 14, n. 9, p. 413–420, Sep. 2006.

LU, P. L. *et al.* Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 63, n. 4, p. 641–647, Apr. 2009.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiol and Infect**, Oxford, v. 1, n. 46, p. 1254–1263, Apr. 2011.

MARRA, A. R. *et al.* Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 5, p. 1866–1871, May. 2011.

MARTINS, A. F. *Acinetobacter* multirresistente – um desafio para a saúde pública multidrug-resistant *Acinetobacter* – a challenge for public health. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 23, n.1, p. 56–62, Feb. 2013.

MARTINS, A. F. *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. **Infection**, Munich, v. 37, n. 5, p. 474-476, Oct. 2009.

MCDONALD, L. C. *et al.* Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987 – 1996. **Clinical Infection Diseases**, Atlanta, v. 29, n. 1, p. 1133–1137, Mar. 1996.

MALHOTRA, J. *et al.* *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ames, v. 62, n. 1, p. 2883-2890, Jan. 2012.

MALTEZOU, H. C. Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 33, n. 5, p. 405- 407, May. 2009.

MENDES, R. E. *et al.* Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase- encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 2, p. 544–547, Feb. 2007.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, n. 12. p. 1581-1588, Dec. 2007.

MUNOZ-PRICE, L. S. *et al.* *Acinetobacter* infection. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 358, n.12, p. 1271-1281, Mar. 2008.

NEMEC, A. *et al.* *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ames, v. 51, n. 5, p. 1891-1899, Sep. 2001.

NEMEC, A. *et al.* *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ames, v. 59, p. 118-124, 2009.

NEMEC, A. *et al.* *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ames, v. 60, n. 4, p. 896-903, Apr. 2010.

NEMEC, A. *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*- *Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). **Research in Microbiology**, Paris, v. 162, n. 4, p. 393-404, May. 2011.

NISHIMURA, Y. *et al.* *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ames, v. 38, n.2, p. 209-211, Apr. 1988.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical microbiology and infection**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 321–331, Jun. 2002.

NORDMANN, P. *et al.* How to detect NDM-1 producers. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 2, p. 718–721, Feb. 2011.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Colonization by resistant micro-organism and infection related to health care. **Acta Paul Enferm**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 183–189, Aug. 2012.

OPAZO, A. *et al.* OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v. 6, n. 4, p. 2–7, Dec. 2012.

PELEG, A. Y. *et al.* *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 59, n. 1, p. 128–131, Jan. 2007.

PELEG, A. Y. *et al.* *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 21, n. 3, p. 538–582, Jul. 2008.

PEREZ, F. *et al.* Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 10, p. 3471–3484, Oct. 2007.

POIREL, L. *et al.* Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 1, p. 24–38, Jan. 2010.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clinical microbiology and infection**, Oxford, v. 12, n. 9, p. 826–836, Sep. 2006.

QUEENAN, A. M. *et al.* Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 3, p. 440–458, Jul. 2007.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 132, p. 365–386, Jan. 2000.

SÁ CAVALCANTI, F. L. *et al.* Emergence of extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 77, n. 3, p. 250–251, Nov. 2013.

SANCHEZ, J. C. *et al.* Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 13, n. 1, p. 47, Jan. 2013.

SERGENT, A. P. *et al.* Bacterial contamination of the hospital environment during wound dressing change. **Orthopaedics and Traumatology**, Munich, v. 98, n. 4, p. 441–445, Jun. 2012.

SCOLA, B. *et al.* Human Body Louse. **Emerging Infectious Diseases**. Marseille, v. 10, n. 9, p. 1671–1673, Sep. 2004.

SINGH, A. *et al.* Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 3, p. 512–530, Jul. 2006.

TAMURA, K. *et al.*, MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.30, n. 12, p. 2725-2729, Oct. 2013.

TOGNIM, M. C. B. *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. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 8, n. 5, p. 284–291, Sep. 2004.

TOGNIM, M. C. B. *et al.* Dissemination of IMP-1 metallo- beta -lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infection control and hospital epidemiology**, New Jersey, v. 27, n. 7, p. 742–747, Jul. 2006.

TOLEMAN, M. A. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 50, n. 5, p. 673–679, Oct. 2002.

TURTON, J. F. *et al.* Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 8, p. 2974–2976, Agu. 2006.

VALLENET, D. *et al.* Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. **PloS one**, San Francisco, v. 3, n. 3, p. 1805-1816, Jan. 2008.

VANEECHOUTTE, M. *et al.* Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello *et al.* 1997 sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ames, v. 59, p. 1376-1381, Jun. 2009.

VAZ-MOREIRA, I. *et al.*, *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ames, v. 61, n. 12, p. 2837-2843, Jan. 2011.

WALSH, T. R. *et al.* Metallo- β -Lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 2, p. 306–325, Apr. 2005.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, v. 57, n. 3, p. 373–383, Mar. 2006.

WERNECK, J. S. *et al.* OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, v. 66, n. 2, p. 452–454, Feb. 2011.

WINN, W. C. *et al.* **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology** 6th ed. Baltimore, 2006, p. 353-355.

WISPLINGHOFF, H. *et al.* Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 39, n. 3, p. 309–317, Agu. 2004.

WOODFORD, N. *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 27, n. 4 p. 351–353, Mar. 2006.

ZANDER, E. *et al.* Detection of intrinsic blaOXA-51-like by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 303, n. 2, p. 88-89, Mar. 2013.

ZARRILLI, R. *et al.* Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 11–19, Jan. 2013.

ZAVASCKI, A. P. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 56, n. 6, p. 1148–1151, Dec. 2005.

ZHOU, H. *et al.* Genomic analysis of the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain MDR-ZJ06 widely spread in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 10, p. 4506–4512, Oct. 2011.

APÊNDICE A - Quadro 1

Quadro 1 - Resultados obtidos neste estudo.

(continua)

N°	Sítio de coleta	Imipenem Valor (R/S)	Meropenem Valor (R/S)	Teste fenotípico				Teste fenotípico		
				<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-143}	<i>bap</i> 600pb	<i>bap</i> >1000pb	
				+/ -	+/ -	+/ -	+/ -	+ ou -	+ ou -	
1	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Aderente/0,55)	-	+
3	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Aderente/0,40)	-	+
6	Swab Nasal	>=16 R	>=16 R	+	-	+	-	+ (Aderente/0,48)	+	-
8	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	+	-	+	+	+ (Aderente/0,58)	+	-
12	Liquor	>=16 R	>=16 R	+	-	+	-	+ (Aderente/0,87)	+	-
15	Urina	>=16 R	>=16 R	+	-	+	-	+ (Aderente/0,45)	+	-
16	Ferida	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Aderente/0,69)	+	-
23	Cateter	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Moderado/0,22)	+	-
24	Liquor	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Aderente/0,38)	+	-
29	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	+	-	+	-	+ (Aderente/0,40)	+	-
33	Swab Retal	>=16 R	>=16 R	+	-	+	-	- (Não aderente/0,04)	+	-
	Liquido									
35	Peritoneal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	- (Não aderente/0,06)	+	-
38	Cateter	>=16 R	>=16 R	-	-	+	-	- (Não aderente/0,07)	+	-
43	Liquor	>=16 R	>=16 R	-	-	+	-	+ (Moderado/0,12)	+	-
46	Ferida	>=16 R	>=16 R	-	+	+	-	- (Não aderente/0,07)	-	-
55	Liquor	>=16 R	>=16 R	-	+	+	-	- (Não aderente/0,04)	-	-
63	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	+	+	-	- (Não aderente/0,10)	-	-
64	Cateter	>=16 R	>=16 R	-	+	+	+	- (Não aderente/0,07)	+	-
	Secreção									
66	Traqueal	>=16 R	>=16 R	+	-	+	-	- (Não aderente/0,06)	+	-
67	Liquor	>=16 R	>=16 R	-	+	+	+	+ (Moderado/0,21)	+	-

								(continua)		
Número	Sítio de coleta	Imipenem	Meropenem	Teste fenotípico				<i>bap</i> 600pb	<i>bap</i> >1000pb	
				<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-143}			
68	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	- (Não aderente/0,04)	-	+
71	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	-	-	+ (Moderado/0,13)	-	-
75	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	- (Não aderente/0,02)	-	+
80	Cateter	<=1 S	<=0.25 S	-	-	+	-	+ (Moderado/0,12)	+	-
81	Liquor	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Moderado/0,24)	+	-
82	Swab Nasal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	- (Não aderente/0,08)	+	-
83	Sec Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Moderado/0,12)	-	-
84	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	+	-	+	-	+ (Aderente/0,5)	+	-
85	Liquor	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	- (Não aderente/0,03)	-	+
86	Liquor	>=16 R	>=16 R	-	-	+	-	- (Não aderente/0,08)	+	-
88	Sec. Traqueal Ponta de	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	- (Não aderente/0,10)	-	+
89	Cateter	>=16 R	>=16 R	-	-	+	-	- (Não aderente/0,05)	-	+
90	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	-	- (Não aderente/0,07)	+	-
91	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	-	- (Não aderente/0,09)	+	-
92	Liquor	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	- (Não aderente/0,09)	+	-
93	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	+	-	+	-	+ (Moderado/0,15)	+	-
94	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	+	-	+	-	+ (Aderente/0,33)	+	-
96	Hemocultura	>=16 R	>=16 R	+	-	+	-	- (Não aderente/0,10)	+	-
97	Hemocultura	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	- (Não aderente/0,07)	+	-
98	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	- (Não aderente/0,06)	-	+
99	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	- (Não aderente/0,11)	-	+
100	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	+	+	-	- (Não Aderente/0,08)	-	-
101	Hemocultura	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Aderente/0,36)	-	-
102	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Moderado/0,23)	+	-

		(conclusão)								
Número	Sítio de coleta	Teste fenotípico						bap 600pb	bap >1000pb	
		Imipenem	Meropenem	bla _{OXA-23}	bla _{OXA-24}	bla _{OXA-51}	bla _{OXA-143}			
103	Ponta de Cateter	>=16 R	>=16 R	-	-	+	-	+ (Moderado/0,14)	-	+
	Líquido									
104	Peritoneal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Moderado/0,12)	-	+
105	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Moderado/0,15)	-	+
106	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	+	+	-	- (Não aderente/0,05)	-	-
107	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	-	- (Não aderente/0,09)	+	-
108	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	+	+	-	+ (Moderado/0,18)	+	-
109	Sec. Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	+	+	+	- (Não aderente/0,03)	-	+
110	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	+	+	+	+ (Moderado/0,17)	-	+
111	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Moderado/0,13)	-	+
112	Sec. Traqueal	<=1 S	<=0.25 S	-	-	+	+	+ (Moderado/0,24)	+	-
118	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	-	+ (Aderente/0,50)	+	-
121	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	- (Não aderente/0,08)	+	-
124	Cateter	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Moderado/0,2)	+	-
126	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Moderado/0,21)	+	-
128	Sec.Traqueal	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Aderente/0,48)	+	-
130	Sec.Traqueal	<=1 S	1 S	-	-	+	-	+ (Moderado/0,20)	-	+
131	Sec.Traqueal	<=1 S	1 S	-	-	+	-	- (Não aderente/0,02)	-	-
132	Cateter	>=16 R	>=16 R	-	-	+	-	- (Não aderente/0,01)	-	+
133	Liquor	<=1 S	0.5 S	-	-	+	-	+ (Moderado/0,121)	+	-
134	Líquor	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Aderente/0,46)	+	-
135	Sec Traqueal	<=1 S	<=0.25 S	+	-	+	-	+ (Aderente/0,29)	+	-
136	Cateter	>=16 R	>=16 R	-	-	+	-	- (Não aderente/0,03)	-	+
137	Cateter	>=16 R	>=16 R	-	-	+	+	+ (Moderado/0,2)	+	-

Fonte: A autora