

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* RESISTENTES AOS
CARBAPENÊMICOS NA CIDADE DE PORTO ALEGRE**

Aluna: ANDREZA FRANCISCO MARTINS

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Tese de Doutorado

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* RESISTENTES AOS
CARBAPENÊMICOS

Aluna: Andreza Francisco Martins

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Tese de Doutorado

2010

Este trabalho foi realizado no Serviço de Patologia Clínica nos Laboratórios da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sendo financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE).

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Dr. Afonso Luís Barth, pelas oportunidades de aprendizado que me proporcionou, por sua amizade, dedicação e exemplo de profissionalismo;

À Faculdade de Medicina pela oportunidade de realizar este curso de Pós-Graduação;

Aos mestres que tanto contribuíram para minha formação;

Aos colegas da Vigilância em Saúde pelo apoio e incentivo;

Aos colegas dos laboratórios de Microbiologia e dos Serviços de Controle de Infecção por disponibilizarem as amostras clínicas e pelo auxílio durante a realização deste trabalho;

Aos amigos e colegas da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do HCPA pelo companheirismo, auxílio e discussões dos experimentos;

Aos alunos e bolsistas de iniciação científica por toda dedicação na execução deste trabalho;

Aos meus amigos e familiares pelo incentivo e apoio para a conclusão deste trabalho;

Ao Marcelo, pelo amor, compreensão, auxílio e dedicação que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. Lista de Tabelas e Figuras.....	7
2. Resumo	8
3. Abstract.....	9
4. Introdução.....	11
5. Revisão da Literatura.....	13
5.1. Características do Gênero.....	13
5.1.1. <i>Taxonomia</i>	13
5.2. Identificação Laboratorial	14
5.2.1. <i>Identificação Fenotípica</i>	14
5.2.2. <i>Identificação Genotípica</i>	15
5.3. Distribuição na Natureza	15
5.4. Fatores de Virulência.....	16
5.5. Mecanismos de Resistência.....	17
5.5.1. <i>Resistência aos β-lactâmicos</i>	19
5.5.1.1. <i>β- Lactamases</i>	19
5.5.1.1.1. <i>Metalo-β- Lactamases</i>	21
5.5.1.1.2. <i>Oxacilinases</i>	23
5.5.1.2. <i>Bombas de efluxo</i>	26
5.5.1.3. <i>Alteração da Permeabilidade da Membrana Externa</i>	27
5.5.1.4. <i>Modificação do Sítio de ação do Antimicrobiano</i>	28
5.5.2. <i>Mecanismos de Resistência a outros Antimicrobianos</i>	28
5.6. Identificação Laboratorial de Carbapenemases	29
5.6.1. <i>Testes Fenotípicos</i>	29
5.6.2. <i>Testes Genotípicos</i>	30
5.7. Métodos de Tipagem Molecular	30
5.7.1. <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE</i>	31
5.7.2. <i>Métodos baseados em PCR</i>	33
5.7.3. <i>Outros Métodos de Tipagem</i>	34
5.8. Epidemiologia das Infecções.....	36
5.8.1. <i>Fatores de Risco</i>	38
5.8.2. <i>Características dos Surtos</i>	38
5.8.3. <i>Relatos de Surtos</i>	39

5.9. Disseminação Global de CRAB	42
5.10. Medidas de Controle de Infecção	44
5.11. Tratamento	47
6. Objetivos	50
6.1. Objetivo Geral	50
6.2. Objetivos Específicos	50
7. Referências	51
8. Tabelas	71
9. Figuras	74
10. Artigos	78
10.1. Artigo 1 em Inglês.....	78
10.2. Artigo 1 em Português.....	88
10.3. Artigo 2 em Inglês.....	98
10.4. Artigo 2 em Português.....	117
10.5. Artigo 3 em Inglês.....	136
10.6. Artigo 3 em Português.....	147
10.7. Artigo 4 em Inglês.....	157
10.8. Artigo 4 em Português.....	165
11. Considerações Finais	173

1. LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Título	pg
Tabela 1. Descrição das Espécies de <i>Acinetobacter</i> spp	71
Tabela 2. β - Lactamases identificadas em <i>A. baumannii</i>	72
Tabela 3. Subgrupos de OXA-carbapenemases identificadas em <i>A. baumannii</i>	73
Figura 1. Fatores que contribuem para a permanência no ambiente, infecção e colonização de pacientes por <i>A. baumannii</i>	74
Figura 2. Resumo da distribuição e contexto genético enzimas do tipo OXA em <i>A. baumannii</i>	75
Figura 3. Representação esquemática da origem do gene <i>bla</i> _{OXA-23} .	76
Figura 4. Fatores importantes na emergência e disseminação de <i>Acinetobacter</i> sp. MDR	77

2. RESUMO

Acinetobacter baumannii é um patógeno oportunista envolvido em um amplo espectro de infecções hospitalares, incluindo bacteremia, meningite secundária e infecção do trato urinário, mas sua maior prevalência é como agente de pneumonia hospitalar, particularmente pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes internados em unidades de terapia intensiva.

Os antimicrobianos carbapenêmicos são normalmente os tratamentos de escolha dessas infecções, principalmente a partir do advento da emergência de resistência a outros antimicrobianos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. A resistência específica aos carbapenêmicos pode estar relacionada à perda de porinas, mas de forma mais significativa, à produção de β -lactamases da classe B (metalo- β -lactamases- MBL) e da classe D (OXA-carbapenemases)

Em Porto Alegre, uma cidade com 1,4 milhões de habitantes e 7223 leitos situados em 25 hospitais, o primeiro caso de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAb) foi identificado somente em 2004. A partir de julho de 2007 o Departamento de Saúde Local instituiu uma notificação obrigatória de casos de infecção/colonização. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as características epidemiológicas e moleculares dos isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos coletados na cidade de Porto Alegre entre 2007 e 2008.

Dezoito hospitais notificaram 1260 casos de colonização/infecção por CRAb entre julho de 2007 e dezembro de 2008, sendo 609 casos considerados como infecção. A maioria (61,8%) dos pacientes era do sexo masculino e tinha mais de 50 anos (66,5%). Foi constatado que 85,2%, 85,3% e 72,4% dos pacientes foram submetidos ao uso de cateter venoso central, sonda vesical e ventilação mecânica, respectivamente.

Carbapenemases do tipo MBL e OXA foram pesquisadas em 584 isolados coletados entre julho de 2007 e julho de 2008 de pacientes infectados/colonizados em 5 diferentes hospitais. O gene *bla*_{OXA-23} foi identificado em 95% dos isolados e nenhum isolado foi positivo para MBL na reação de PCR com os *primers* utilizados (IMP-1, VIM-2 e SPM-1).

Para avaliar a relação genética entre os isolados de CRAb dos diferentes hospitais, 240 isolados de pacientes admitidos nas UTIs de cinco hospitais entre julho de 2007 e julho de 2008 foram analisados através dos métodos de REP-PCR e PFGE. Oito grupos clonais majoritários foram obtidos e foi constatada a disseminação de 3 grupos clonais distintos em todos os hospitais, evidenciando a disseminação inter-institucional. Além disso, com o uso da técnica de PFGE foi possível constatar a similaridade genética entre isolados recuperados do ambiente, de equipamentos de RX, das mãos de profissionais da saúde e de materiais clínicos de pacientes, evidenciando a importância do ambiente na disseminação de CRAb.

3. ABSTRACT

The species of *Acinetobacter*, particularly *Acinetobacter baumannii*, are involved in a wide spectrum of infections, including bacteremia, secondary meningitis and urinary tract infection, nevertheless its prevalence is higher as an agent of nosocomial pneumonia, particularly pneumonia associated with mechanical ventilation in hospitalized patients in intensive care units.

The carbapenem antibiotics are usually the treatment of choice for *Acinetobacter* infections, since the advent of the emergence of resistance to other antimicrobials β -lactams, aminoglycosides and fluoroquinolones. The resistance to carbapenems may be related to the loss of porins, but more significantly, the production of β -lactamases of class B (metallo- β -lactamase- MBL) and class D (OXA-type carbapenemases).

In Porto Alegre, a city with 1,4 million and 7223 beds located in 25 hospitals, the first case of *A. baumannii* resistant to carbapenems (CRAb) was identified only in 2004. Since July 2007 the Department of Health Local determined that all cases of infection/colonization by CRAb should be informed. Thus, the objective of this study was to evaluate the epidemiological and molecular characteristics of isolates of *Acinetobacter* sp. resistant to carbapenems collected in the city of Porto Alegre in 2007 and 2008.

Eighteen hospitals reported 1260 cases of colonization / infection by CRAb between July 2007 and December 2008, with 609 cases considered to infection. Most patients (61.8%) were men and (66.5%) were more 50 years old range. It was showed that 85.2%, 85.3% and 72.4% of patients used central venous catheter, urinary catheter and they were submitted to mechanical ventilation, respectively.

MBL and OXA carbapenemases were investigated in 584 isolates from 7 different hospitals collected between July 2007 and July 2008 from patients infected / colonized. The bla_{OXA-23} gene was identified in 95% of the isolates but none isolate were positive for MBL by PCR with primers used (IMP-1, VIM-2 and SPM-1).

To assess the genetic relationship among isolates of CRAb the different hospitals, 240 isolates from patients admitted to ICUs of five hospitals between July 2007 and July 2008 were analyzed using the methods of REP-PCR and PFGE. Eight majority clonal groups were obtained and it was found the spread of 3 clonal groups distinct in all hospitals, showing the spread of inter-institutional. Furthermore, using the technique of PFGE, we determined the genetic similarity among isolates recovered from the environment, equipment RX, the hands of health professionals and clinical materials of patients, indicating the importance of environment in the spread of CRAb.

4. INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* spp. compreende 31 espécies diferentes sendo que 17 delas não foram nomeadas pois raramente são isoladas em humanos [1]. Entre as diferentes espécies, *A. baumannii* é considerada a espécie de maior importância clínica. Esta espécie faz parte do complexo *A. baumannii-calcoaceticus* que compreende 4 diferentes espécies (*Acinetobacter* genoespécie 3 e 13TU, *A. calcoaceticus* e *A. baumannii*). Estas espécies são distinguíveis apenas por métodos genotípicos, o que é impraticável na rotina do laboratório de microbiologia clínica [2]. Assim, a identificação deste complexo em nível de espécie fica restrita aos laboratórios de referência.

A. baumannii é responsável por numerosos tipos de infecções, como pneumonias, bacteremias, infecções urinárias e meningites, especialmente em pacientes imunocomprometidos [3] sendo considerado um patógeno oportunista de grande importância nas infecções nosocomiais. Os carbapenêmicos são normalmente o tratamento de escolha dessas infecções, principalmente com a emergência de resistência a outros β -lactâmicos, aos aminoglicosídeos e fluorquinolonas.

Diferentes mecanismos estão envolvidos com a resistência aos β -lactâmicos, como produção de β -lactamases, reduzida permeabilidade da membrana externa, perda de porinas, alterações nos sítios de ligação dos antibióticos e a hiperexpressão de bombas de efluxo [4].

No gênero *Acinetobacter* spp. resistência específica aos carbapenêmicos está relacionada à perda de porinas, mas de forma mais significativa, à produção de β -lactamases da classe B (metalo- β -lactamases) e da classe D (OXA-Carbapenemases) [5].

Durante a última década, o tratamento dessas infecções tem se tornado crítico, em função do surgimento de cepas multirresistentes cuja disseminação

tem sido associada à contaminação de equipamentos hospitalares (respiradores, ar-condicionado, equipamentos para diagnóstico por imagem, etc.) e/ou através das mãos colonizadas da equipe assistencial [3]. A emergência da resistência aos carbapenêmicos tem limitado o tratamento ao uso de polimixinas como principal opção terapêutica. No entanto, alguns estudos têm mostrado que a concentração inibitória mínima da colistina para os isolados de *Acinetobacter* resistentes aos carbapenêmicos (CRA), tem se elevado o que representa uma situação crítica [1].

Assim, o aumento da frequência de infecções hospitalares associadas a espécies de *Acinetobacter* e o rápido desenvolvimento de resistência destes organismos, têm se tornado um problema grave de saúde pública e o entendimento sobre a disseminação dos mecanismos de resistência responsáveis por esta situação é fundamental para manejar melhor estas infecções.

5. REVISÃO DA LITERATURA

5.1. Características do Gênero

O gênero *Acinetobacter* spp. apresenta-se como cocobacilos gram-negativos, aeróbio estrito, não-fermentador da glicose, imóvel, catalase-positiva, oxidase-negativa, não-fastidioso que crescem bem no Agar sangue formando colônias branco-acinzentadas e no Agar MacConkey com colônias levemente rosadas normalmente cremosas mas que podem eventualmente ter aspecto mucóide. Este gênero pertence à família *Moraxellaceae* que inclui ainda os gêneros *Moraxella* e *Psychrobacter* [1].

5.1.1. Taxonomia

A história taxonômica deste gênero é bastante complexa e tem sido amplamente modificada nos últimos 30 anos. Inicialmente denominado *Micrococcus calcoaceticus*, em 1954 foi classificado como gênero *Acinetobacter* spp. quando diferentes espécies foram agrupadas de acordo com suas características fenotípicas comuns. No primeiro momento apenas a espécie *A. calcoaceticus* foi considerada como pertencente a este gênero. Estudos posteriores evidenciaram que algumas cepas desta espécie tinham a capacidade de acidificar a glicose e outras não. Assim, foi descrita a espécie *A. Iwoffii* [1] que é considerada assacarolítica [6, 7].

Com a evolução das técnicas de biologia molecular, Bouvet e Grimont (1986) publicaram outra classificação baseada na homologia do DNA, contendo 12 genoespécies dentre as quais o *A. baumannii* [6, 7]. A partir desta classificação, diferentes estudos identificando novas espécies foram publicados (Tabela 1). A espécie *A. calcoaceticus* foi dividida em 4: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, genoespécie 3 e genoespécie 13TU que formam o complexo *A. baumannii*-

calcoaceticus devido a dificuldade na separação destas espécies a partir de testes convencionais [3, 6, 8].

Muitos trabalhos publicaram a identificação de espécies já descritas como sendo novas espécies e por isso o número total de espécies do gênero é variável em diferentes publicações [1].

Até o momento, já foram descritas 31 genoespécies baseadas na homologia do DNA, sendo que 14 foram nomeadas e as demais são classificadas em ordem numérica, associada ou não às iniciais dos autores que primeiramente as identificaram (Tabela 1) [1, 3].

5.2. Identificação Laboratorial

5.2.1. Identificação Fenotípica

A identificação do gênero baseia-se nas suas características fenotípicas (já descritas), mas a identificação em nível de espécie é bastante complexa. O sistema com mais de 20 diferentes testes inicialmente proposto por Bouvet e Grimont em 1986 e revisto em 1991 [6, 8] não é amplamente utilizado e espécies fortemente relacionadas geneticamente não são separadas adequadamente com este sistema. O maior problema é que as espécies mais relevantes clinicamente *A. baumannii*, genoespécie 3 e genoespécie 13TU, não conseguem ser distinguidas da espécie *A. calcoaceticus* considerada de origem ambiental [3, 8].

De modo semelhante, os sistemas de identificação comerciais também não são capazes de separar as espécies do complexo *A. baumannii-calcoaceticus* e assim, os métodos fenotípicos rotineiramente utilizados nos laboratórios de microbiologia não são suficientemente discriminatórios para diferenciação destas espécies [3].

Assim, diferentes métodos moleculares têm sido propostos para uma melhor identificação das espécies de *Acinetobacter*.

5.2.2. Identificação Genotípica

O método de hibridização de DNA inicialmente proposto para identificação e separação do gênero *Acinetobacter* em nível de espécie, é muito trabalhoso e não tem sido muito utilizado [1, 3]. Atualmente diferentes métodos baseados na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando diferentes iniciadores (*primers*) capazes de amplificar regiões específicas de cada espécie, estão sendo amplamente utilizados. Entre esses métodos, podemos citar a análise da região 16S rRNA e o *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) que são os mais utilizados [3]. Outros métodos, como seqüenciamento da região intergênica do gene 16S-23S rRNA e o seqüenciamento do gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase, também tem sido muito utilizados [1, 3].

A identificação da espécie *A. baumannii* pode ser confirmada também com a identificação do gene *bla*_{OXA-51-like} o qual é intrínseco à espécie [9]. Uma técnica simples de Multiplex PCR pode identificar esse gene em conjunto com outros genes que codificam oxacilinasas [10] (ver página 30).

5. 3. Distribuição na Natureza

O gênero *Acinetobacter* possui elevada versatilidade nutricional e metabólica, podendo adaptar-se facilmente em diferentes ambientes. Várias espécies têm sido isoladas do solo, da água, de vegetais, de animais, da pele e do trato gastrointestinal de seres humanos saudáveis. Além disso, no ambiente hospitalar, algumas espécies têm sido isoladas de objetos inanimados tais como equipamentos de Raios-X, bancadas, leitos, ventiladores e em sistemas de circulação de ar [1, 3, 11, 12].

As espécies mais comumente encontradas na natureza são: *A. calcoaceticus*, *A. johnsonii*, *A. Iwoffii*, *A. radioresistens* e *Acinetobacter* genoespécie 3. As espécies mais comumente encontradas como colonizantes da pele humana são *A. baumannii*, *A. johnsonii*, *A. Iwoffii* e *A. radioresistens*. Fato bastante relevante é que a espécie de maior importância clínica, *A. baumannii*, raramente tem sido identificada em fontes ambientais e a prevalência da colonização em pacientes da comunidade por esta espécie é extremamente baixa [1, 3].

5. 4. Fatores de Virulência e Patogenicidade de *A. baumannii*

A. baumannii é a espécie de maior importância clínica do gênero *Acinetobacter*. Este patógeno oportunista é responsável por uma série de infecções graves em pacientes debilitados e tem sido associado também a infecções em militares e civis feridos em conflitos como a guerra do Iraque [1, 3, 13].

A prevalência de colonização é bem maior do que a prevalência de infecção por *A. baumannii*, o que sugere uma baixa virulência. Porém, diversos fatores de virulência e patogenicidade já identificados em *A. baumannii* podem ter um importante papel nos mecanismos de colonização e infecção. Entre estes, podemos mencionar a capacidade de se manter viável por longos períodos em superfícies secas, a aquisição de nutrientes essenciais como o ferro, a adesão as células epiteliais levando a apoptose destas e a secreção de produtos tóxicos (enzimas) causando dano tecidual [1, 3].

A formação de biofilme, provavelmente regulada pela atividade de genes do *quorum-sensing* também tem sido demonstrada [14]. O biofilme facilita a adesão bacteriana a materiais plásticos como cateteres e tubos de ventilação mecânica, favorecendo a colonização e infecção dos pacientes [3, 14, 15]. Além disso, a interação do pili e do lipopolissacarídeo (LPS) promovendo adesão às células hospedeiras pode ser a primeira etapa na colonização. O LPS de *A. baumannii*

tem sido apontado como o componente principal na estimulação do sistema imune levando a uma resposta pró-inflamatória na pneumonia em modelo animal [16]. Um resumo dos fatores de virulência pode ser visualizado na figura 1 [3].

Entretanto, existem poucos relatos sobre a base molecular e bioquímica destes fatores 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 [1].

5.5. Mecanismos de Resistência

Os mecanismos de resistência podem ser intrínsecos ou adquiridos, sendo que ambos têm sido observados em *A. baumannii*. Os mecanismos de resistência são provenientes da evolução da bactéria, sendo usados como forma de proteção do microrganismo. A resistência intrínseca é previsível, estando relacionada com a baixa permeabilidade da membrana externa, sistema ativo de efluxo, produção de β -lactamases e de enzimas inativadoras de outros antimicrobianos como aminoglicosídeos e quinolonas [17, 18].

A resistência adquirida resulta de uma alteração fisiológica ou estrutural na bactéria, não sendo previsível. Pode ou não envolver alterações genéticas. Quando há alterações genéticas, estas podem ocorrer por mutação, transdução, transformação ou conjugação. Quando não há alteração genética, pode ocorrer a indução de um fenótipo devido às condições do meio, que pode ser estável e permanecer mesmo quando o fator de exposição for retirado, ou instável, desaparecendo juntamente com o fator de exposição [19].

Mecanismos de resistência importantes têm sido descritos nos últimos anos para *A. baumannii*. A elevada plasticidade genética de *A. baumannii* favorece a captação de genes dos reservatórios ambientais e, além disso, a hiperexpressão

de mecanismos intrínsecos, como bombas de efluxo e também as suas características celulares como a baixa permeabilidade da membrana externa contribuem para a resistência aos antimicrobianos [1].

O contexto genético envolvido na resistência de *A. baumannii* é complexo e diverso. Vallenet e colaboradores seqüenciaram o genoma de 3 cepas diferentes de *Acinetobacter*, sendo duas da espécie *A. baumannii*, isoladas de humanos, uma multirresistente (MDR) e outra multisensível [20]. Neste estudo, foi caracterizado que a cepa MDR apresentava uma grande “ilha de resistência” (86-kb) onde se localizavam 45 dos 52 genes de resistência identificados. Dentro desta região foram identificadas 88 seqüências abertas de leitura (*open reading frames*), das quais 82 foram relacionadas à *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp. e *E. coli*. Muitos elementos genéticos móveis tais como integrons, transposons e seqüências de inserção também foram identificadas nesta região que não foi encontrada na cepa multisensível. O mais curioso é que os três plasmídios identificados não estavam localizados neste contexto e não possuíam nenhum gene de resistência [20].

Mak e colaboradores investigaram a presença de diferentes determinantes de resistência em isolados nosocomiais de *A. baumannii* MDR [21]. O estudo avaliou isolados provenientes de dois hospitais da Austrália e relacionaram a resistência aos carbapenêmicos à presença do gene *bla*_{OXA-23} associado ao elemento promotor *ISAbal*. A resistência às cefalosporinas foi associada à expressão de AmpC (também associada ao elemento *ISAbal*), mutação na *GyrA* foi associada a resistência as quinolonas, o gene *tet(B)* determinou a resistência as tetraciclina, *bla*_{TEM-1} e *strB* contribuíram para a resistência aos β-lactâmicos e aminoglicosídeos, respectivamente. Integrons de classe 1 foram associados a um gene cassette contendo determinantes de resistência a gentamicina, estreptomicina e espectinomicina [21].

Estes dados demonstram a elevada capacidade que este gênero possui de adquirir elementos genéticos móveis e revelam que o nicho ecológico da cepa

MDR está diretamente relacionado com sua diversidade genética e sua capacidade de adaptação ao meio [1, 20].

5.5.1. Resistência aos β -lactâmicos

5.5.1.1. β -Lactamases

De um modo geral, os β -lactâmicos atuam inibindo a última etapa da síntese de peptidoglicano por inibição da transpeptidase. Além disso, as Proteínas de Ligação da Penicilina (PBP) participam na síntese do peptidoglicano e no processo de divisão celular [22]. Para ter ação antimicrobiana, os β -lactâmicos precisam penetrar na parede celular e se ligar às PBPs. No caso dos Gram-positivos, esse processo é facilitado pela presença das camadas de peptidoglicano que possui uma característica mais hidrofílica. Já nos Gram-negativos, como *A. baumannii*, esse processo torna-se mais difícil, uma vez que sua parede celular apresenta uma camada de lipopolissacarídeos ancorada na membrana externa que também dificulta a penetração de fármacos hidrofílicos. Além disso, *A. baumannii* carece das porinas de alta permeabilidade que permitem que o fármaco penetre na célula. Por isso, apenas alguns β -lactâmicos específicos apresentam atividade contra *A. baumannii*.

Além disso, para que tenham ação, os β -lactâmicos necessitam do anel β -lactâmico intacto. As β -lactamases são enzimas que rompem o anel β -lactâmico inativando o antibiótico. Essas enzimas são classificadas de acordo com sua homologia na seqüência de aminoácidos (classificação de Ambler) ou de acordo com sua preferência por determinado substrato (classificação de Bush) [23]. Entre as principais β -lactamases, destacam-se as AmpC, ESBL e carbapenemases. Algumas bactérias podem expressar essas enzimas de modo constitutivo, no seu cromossomo, ou adquiri-las através dos fenômenos de conjugação ou recombinação homóloga [18, 24].

A. baumannii possui AmpC de origem cromossomal cuja expressão é regulada pela seqüência promotora denominada IS*Aba1*. A hiperexpressão de AmpC confere resistência as cefalosporinas de amplo espectro, entretanto cefepime e carbapenêmicos não são hidrolizados por essa enzima [1].

Algumas variantes de β -lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) têm sido relatadas em *A. baumannii* (Tabela 2) [25], no entanto a detecção fenotípica laboratorial é difícil devido à presença de outros mecanismos que interferem nos testes de ESBL. Deste modo, a real prevalência destas enzimas em *A. baumannii* é desconhecida [1].

Entre as diferentes β -lactamases presentes em *A. baumannii*, as carbapenemases adquiridas têm se tornado um problema de saúde pública nos últimos anos [23, 24]. Essas enzimas pertencem à classe B de Ambler e ao grupo 2b de Bush e apesar de possuírem características bioquímicas muito distintas, todas possuem a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos [5, 23, 24].

As carbapenemases adquiridas estão normalmente associadas à plasmídios, integrons e transposons que são estruturas que facilitam a disseminação horizontal destas enzimas. Além disso, nestes elementos genéticos móveis normalmente são encontrados genes de resistência a outros antimicrobianos [24].

Diferentes surtos causados por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAb) , têm sido associados a produção destas enzimas cujo significativo impacto clínico e epidemiológico vêm sendo descrito [3, 5]. Oxacilinases (OXA) e Metallo- β -Lactamases (MBL) são as enzimas mais comumente identificadas, sendo que a prevalência de OXA tem sido bastante elevada em CRAb [5]. Carbapenemases da classe A de Ambler (KPC) foram relatadas em *A. baumannii* somente em Porto Rico, até o momento [26].

5.5.1.1.1. Metallo- β -Lactamases

As MBL são enzimas pertencentes à classe B de Ambler e são caracterizadas por possuírem um sítio catalítico que é dependente de cátions divalentes. O zinco, principal cofator utilizado por essas enzimas é quelado por EDTA e compostos derivados do tiol assim como outros cátions divalentes. Assim, essa classe de enzimas é inibida por quelantes e não é afetada pelos inibidores convencionais de β -lactamases, como tazobactam e sulbactam [24]. Essas enzimas atuam sobre os carbapenêmicos preferencialmente, mas algumas também possuem afinidade por cefalosporinas e penicilinas, mas não são ativas contra os monobactâmicos [27].

As MBL são constitutivamente encontradas em uma grande diversidade de bactérias tais como: *S. maltophilia*, *B. cereus*, *Legionella gormanii*, *Chryseobacterium meningosepticum*, entre outras [27]. Entretanto, a maioria destas bactérias possui pouca importância clínica [28].

Muito importante clinicamente, são as variantes de MBL adquiridas, as quais se localizam dentro de uma grande variedade de integrons que estão inseridos em genes cassetes. Quando esses genes associam-se a elementos genéticos móveis tais como plasmídios e transposons, são facilmente transferidos entre diferentes cepas da mesma espécie e ainda entre espécies diferentes [24, 27]. Até o momento foram identificadas seis diferentes famílias de MBL móveis: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenamase), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase), GIM (*Germany* imipenemase), SIM (*Seoul* imipenemase), AIM (*Australian* imipenemase) e KHM (*Kyorin Hospital* metalo- β -lactamase), sendo que as duas primeiras são as mais prevalentes [28, 29].

A primeira MBL móvel foi detectada no Japão em *P. aeruginosa* em 1991 e recebeu a denominação de IMP – “imipenemase” [30]. Essa enzima foi localizada em um plasmídio conjugativo de um isolado clínico e posteriormente foi identificada em membros da família *Enterobacteriaceae*, evidenciando sua

disseminação. Essa família possui mais de vinte variantes descritas por diferentes países, sendo que a IMP-1 é a mais prevalente [24].

A segunda família de MBL associada à integrons, foi a família VIM, identificada em Verona, Itália em 1997 [31] e recebeu a denominação de “Verona Imipenemase”. Posteriormente, foi publicada a identificação de VIM-2 na França [32]. Ambas as enzimas foram identificadas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* sendo que VIM-2 é a mais prevalente [33] tendo já sido encontrada em mais de 30 países e nos cinco continentes. Essa família possui mais de 12 variantes identificadas até o momento [24].

No início desta década, outras famílias de MBL foram identificadas: SPM-1 no Brasil [34], GIM-1 na Alemanha [35], SIM-1 em Seoul [36], AIM na Austrália [37] e KHM no Japão [29]. Até o momento, essas novas famílias parecem restritas aos seus países de origem, enquanto que as famílias IMP e VIM estão disseminadas em diferentes países [24].

Em *Acinetobacter* sp., poucos estudos têm detectado a presença de MBL. O primeiro relato foi de um isolado na Itália, produtor da enzima IMP-2 e posteriormente no Japão. A variante IMP-1 já foi identificada no Japão, Itália e Coreia do Sul, a variante IMP-4 em Hong Kong, Singapura e Austrália (*A. junii*) [38]. Na Coreia foram também identificadas às enzimas VIM-2 e SIM-1, sendo que a última está restrita a este país [5].

No Brasil, há apenas um relato da presença de MBL em *A. baumannii*, referente a um surto na cidade de São Paulo no ano de 2001, associado à produção da enzima IMP-1 [39].

5.5.1.1.2. Oxacilinases

As Oxacilinases (OXA) são enzimas pertencentes à classe molecular D de Ambler e estão incluídas no grupo 2d da classificação de Bush [24]. Sua denominação está associada à capacidade de hidrolisar a oxacilina como substrato preferencial [40]. Mais de 150 variantes diferentes de OXA já foram descritas, e muitas delas são derivadas das OXA-2, OXA-3 e OXA-10 produzidas principalmente por *P. aeruginosa*. A árvore filogenética das β -lactamases tipo OXA apresenta nove subgrupos com base na seqüência de aminoácidos (Tabela 3) [40]. Entre essas enzimas, 45 possuem capacidade de hidrolisar carbapenêmicos, sendo consideradas carbapenemases da classe D [40].

O primeiro isolado de *A. baumannii* com serina β -lactamase capaz de hidrolisar imipenem, foi isolado em 1985 na Escócia [41]. Inicialmente a enzima foi denominada de ARI-1 (*Acinetobacter resistant imipenem*) e posteriormente quando sua seqüência genética foi estudada, verificaram a similaridade com membros da família OXA, sendo então denominada de OXA-23. Depois desta primeira publicação em 1993, muitos relatos de identificação de outras variantes desta família de enzimas em *A. baumannii* foram descritos: OXA-24, -25, -66, -68 na Espanha, OXA-26 na Bélgica, OXA-27 em Singapura, OXA-40, -58, -75 e -76 na França, OXA-49 na China, OXA-64 e -71 na África do Sul, OXA-65 na Argentina, OXA-69 e -78 na Turquia, OXA-70 em Hong Kong e OXA-72 na Tailândia [40] entre outros.

Os subtipos de OXA que possuem elevada similaridade genética fazem parte de um mesmo subgrupo filogenético. Até o momento, em *A. baumannii* foram descritas OXA de 5 subgrupos filogenéticos: OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like e OXA-143 (Figura 2) [1, 42]. As enzimas que pertencem ao subgrupo OXA-23, diferem em 2 a 5 aminoácidos e as que pertencem ao subgrupo OXA-24, diferem em 1 a 5 aminoácidos. O subgrupo OXA-51 possui uma diversidade um pouco maior, sendo que algumas enzimas podem diferir em até 15 aminoácidos. Esse subgrupo é diferente dos demais, pois se caracteriza

por enzimas de ocorrência natural (intrínseca) em *A. baumannii*, sendo utilizadas inclusive para identificação em nível de espécie como já mencionado anteriormente [5, 9, 40]. No quarto subgrupo temos as enzimas OXA-58-, -96 e -97 que possuem [40, 43, 44]. Recentemente, Higgins e colaboradores identificaram uma nova OXA carbapenemase isolada de uma cepa de *A. baumannii* do Brasil, OXA-143 e até o momento sua prevalência é desconhecida [42] (Figura 2).

No Brasil, a primeira descrição de OXA-23 em *A. baumannii* foi em 2003 relacionada a um surto na cidade de Curitiba [45]. Após esse primeiro relato não tivemos mais nenhuma descrição na literatura até o ano de 2009 quando foi descrita a disseminação de diferentes clones produtores de OXA-23 no Rio de Janeiro [46]. Também em 2009 nosso grupo de pesquisa publicou a identificação desta enzima em Porto Alegre e demonstrou a transmissão de um clone de CRAB entre profissionais de saúde, equipamentos médicos e pacientes [47].

Até pouco tempo atrás o gene *bla*_{OXA-23} só havia sido identificado em isolados clínicos. Recentemente, Girlich e colaboradores identificaram este gene em um isolado de *A. baumannii* do ambiente [48].

Alguns estudos têm relatado o contexto genético dos genes que codificam enzimas da família OXA e o seu perfil de hidrólise aos carbapenêmicos com o objetivo de compreender o papel destas enzimas na resistência a estes antimicrobianos [49-52].

Elementos de inserção da família IS4 têm sido associados à resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*, mediada por enzimas da família OXA [5, 49-52]. Em 2005, Heritier e colaboradores identificaram diferenças na susceptibilidade aos carbapenêmicos quando compararam plasmídios recombinantes com plasmídios naturais. Neste estudo, foi observado que a presença de seqüências promotoras IS*Aba1*, de ocorrência natural, *upstream* aos genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-40}, estavam associadas a CIM mais elevada nesses isolados, quando comparados aos isolados recombinantes [49].

Em 2006, Turton e colaboradores relacionaram o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos à presença do elemento de inserção *ISAb₁ upstream* ao gene *bla_{OXA-51}*, demonstrando que apesar de ser intrínseco, esse gene pode estar associado ao aumento da CIM destes isolados para o imipenem [52]. Posteriormente, Corvec e colaboradores demonstraram a presença dos elementos *ISAb₁* e *ISAb₄* na estrutura dos transposons Tn2006 e Tn2007 respectivamente, associados ao gene OXA-23 [50]. Estes transposons codificam uma transposase capaz de mobilizar esta estrutura genética e os elementos de inserção IS atuam como regiões promotoras capazes de promover a hiperexpressão de genes determinantes de resistência. O elemento *ISAb₁*, parece ser único da espécie *A. baumannii* [53].

A origem do gene que codifica a expressão da OXA-23 parece estar associada a uma espécie ambiental, *A. radioresistens* [54]. Poirel e colaboradores investigaram a presença do gene *bla_{OXA-23}* em 14 diferentes espécies do gênero *Acinetobacter*. Essas espécies foram isoladas de fontes clínicas e ambientais. Neste estudo os autores observaram que a única espécie ambiental cuja presença do gene *bla_{OXA-23}* foi identificada, foi a espécie *A. radioresistens*. Através de ensaios de hibridização constataram que este gene localizava-se no cromossomo bacteriano desta espécie. A espécie *A. radioresistens* é considerada comensal e sem importância clínica sendo isolada de diferentes fontes ambientais e também como colonizante da pele humana [1, 55]. Os elementos *ISAb₁* e *ISAb₄* não foram identificados nestas cepas que também não demonstraram atividade de carbapenemase em ensaios de hidrólise. Com estes resultados, os autores sugeriram que *A. radioresistens* é o progenitor do gene *bla_{OXA-23}* e que a disseminação deste para *A. baumannii* estaria associada a transferência do elemento de inserção *ISAb₁* de *A. baumannii* para *A. radioresistens*, mediada por plasmídeo e inserida *downstream* e/ou *upstream* ao gene *bla_{OXA-23}* em *A. radioresistens*, formando uma estrutura de transposon. Esta estrutura móvel pode então ter sido transposta para um plasmídeo de *A. radioresistens* e

posteriormente esse plasmídeo se conjugou com cepas *A. baumannii* disseminando esse determinante de resistência na espécie (Figura 3) [54].

Estudo do SENTRY identificou também a presença do gene *bla*_{OXA-58} em *A. radiresistens* além do gene *bla*_{OXA-23}, reafirmando o importante papel desta espécie como reservatório destes genes de resistência [56].

Alguns estudos têm demonstrado a ocorrência de mais de uma enzima do tipo OXA adquirida em um mesmo isolado [1, 40, 57, 58]. Entretanto, a ocorrência de OXA-carbapenemases com MBL em *A. baumannii*, somente foi evidenciada em um único trabalho na Singapura até o momento [59].

5.5.1.2. Hiperexpressão de Bombas de Efluxo

As bombas de efluxo, presentes em todas as células, são responsáveis pelo transporte de compostos orgânicos tóxicos, para fora da célula [60]. Devido à baixa permeabilidade da membrana externa nos BGN, quando sistemas ativos de efluxo estão presentes, o antimicrobiano terá dificuldade para penetrar novamente através da membrana externa, depois de ter sido expulso da célula [60].

O sistema de efluxo AdeABC pertencente a família RND (*resistance-nodulation-division*) é o mais conhecido e bem estudado. Possui três componentes codificados pelo cromossoma e dois sistemas regulatórios que são transcritos em direção oposta. Mutações podem alterar os mecanismos regulatórios levando a uma hiperexpressão deste sistema [61].

Esses sistemas possuem afinidade por classes estruturalmente diferentes de antimicrobianos tais como carbapenêmicos, aminoglicosídeos, eritromicina, tetraciclina, fluorquinolonas entre outros [60]. Assim, o efeito sinérgico entre este mecanismo e a perda de porinas normalmente está associado à multiresistência [1, 5, 60]. Na França, o estudo de uma cepa epidêmica de CRAB evidenciou que

na região denominada de “ilha de resistência” estavam presentes entre outros genes, 32 ORFs associadas a família RND [20].

Outros sistemas de efluxo, não associados à resistência aos β -lactâmicos, já foram identificados em *A. baumannii* [25, 60].

5.5.1.3. Alteração da Permeabilidade da Membrana Externa

Modificações na permeabilidade da membrana externa de *Acinetobacter* spp. têm sido associada com a resistência aos β -lactâmicos [60, 62, 63]. A bicamada lipídica da membrana externa dos gram-negativos (GN) é impermeável a compostos hidrofóbicos tais como os carbapenêmicos. Deste modo, canais protéicos transportadores, denominados porinas de membrana externa (OMP), são necessários para que estes fármacos consigam atravessar a bicamada lipídica.

Alterações na estrutura molecular das porinas ou na sua expressão genética são importantes mecanismos utilizados pelos BGN para se protegerem da ação dos carbapenêmicos [60]. Até o momento, poucas porinas foram identificadas em *Acinetobacter* spp. [1, 5, 60]. De fato, uma das hipóteses para a baixa permeabilidade da membrana externa de *A.b* quando comparado a outros BGN-NF é o pequeno número e o pequeno tamanho das OMPs [64].

Porinas importantes têm sido associadas à resistência aos β -lactâmicos em *A. baumannii*: OMPs 47, 44 e 37-kDA em cepas endêmicas na cidade de Nova Iorque [63], HMP-AB que é homóloga a OmpA típica de BGN [65], OmpW (homóloga a OmpW de *E. coli* e *P. aeruginosa*) [66], OprD (homóloga a OprD de *P. aeruginosa*) [67] e CarO que é uma estrutura diferenciada e até o momento só identificada em membros da família *Moraxellaceae* [68]. Essa estrutura, CarO, têm sido associada a resistência aos carbapenêmicos em cepas de *A. baumannii*, apesar de não possuir um sítio de ligação específico para imipenem ou meropenem [69].

5.5.1.4. Modificação do Sítio de Ação do Antimicrobiano

Poucos estudos têm pesquisado alterações na afinidade ou na expressão de proteínas ligantes de penicilinas (PBPs) em *A. baumannii*. Fernandez-Cuenca e colaboradores, relacionaram a ausência de uma PBP de 73,2-kDA a resistência aos carbapenêmicos, em associação com a produção de carbapenemases [70, 71]. Outro relato demonstrou a expressão de baixos níveis da proteína ligante de penicilinas 1b em um isolado multirresistente. Entretanto, outros fatores também foram associados à resistência, tais como, a expressão do sistema de efluxo RND e uma alta capacidade de formar biofilme associada ao acúmulo de algumas proteínas da membrana externa, envolvidas nos mecanismos de adesão bacteriana [71].

5.5.2. Mecanismos de Resistência associados a outros antimicrobianos

O mecanismo de resistência mais importante que inativa os aminoglicosídeos é a produção de enzimas (acetiltransferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases) denominadas aminoglicosidases, que modificam a estrutura do antimicrobiano e o tornam inativo. Essas enzimas são codificadas por genes que estão associados aos integrons de classe 1 [72]. Além disso, a expressão de bombas de efluxo [60] e mais recentemente a metilação da região 16S rRNA também foram associados a resistência para estes compostos [73].

Da mesma forma, alterações nas topoisomerasas, devido a mutações dos genes *gyrA* e *parC* já foram relatadas em *A. baumannii* conferindo resistência às quinolonas [74].

O mecanismo mais comum associado à resistência as tetraciclinas em *A. baumannii* é mediado pela expressão de sistemas específicos de efluxo (*tet* (A) a *tet*(E)) e também por sistemas múltiplos tais como o AdeABC [60]. A tigeciclina

que é um novo antimicrobiano da classe das glicilcilinas, não é afetada pelos sistemas específicos que atuam sobre as tetraciclinas, mas é substrato do sistema AdeABC [75].

As polimixinas são uma importante alternativa terapêutica para as infecções causadas por CRAB [1]. Devido ao aumento do seu uso, provavelmente mais casos de resistência serão relatados. Atualmente, poucos estudos têm demonstrado esse fenômeno em *A. baumannii* que está provavelmente associado à baixa afinidade de ligação ao LPS, como já visto em outros BGN [1]. Entretanto a heteroresistência, fato novo, tem sido relatada, mas seu impacto clínico ainda não foi estabelecido [76].

5.6. Identificação Laboratorial de Carbapenemases

5.6.1. Testes Fenotípicos

Os testes fenotípicos utilizados para detecção de carbapenemases ainda requerem atenção e cuidado na sua utilização. Para MBL os testes mais utilizados são o de aproximação de disco [77] e o Etest MBL [78]. Ambos baseiam-se na capacidade que os quelantes metálicos possuem de inibir a ação enzimática permitindo então que o antimicrobiano exerça sua atividade. Entretanto, como existem muitas variantes de MBL, os resultados destes testes dependem da capacidade hidrolítica da enzima que está presente o que pode levar a falhas de interpretação [1, 79]. Martins e colaboradores identificaram a presença de IMP-1-like em isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram CIM $\leq 4\mu\text{g/mL}$ o que tornou a interpretação do Etest MBL inconclusiva [79].

Para identificação de OXA, não há teste fenotípico descrito, sendo necessário o uso de técnicas moleculares. Além disso, cabe ressaltar que alguns trabalhos mostram que essa família de carbapenemases possui atividade maior quando estabilizadas por cátions divalentes e assim poderiam apresentar resultado falso positivo no teste de triagem para MBL [1, 24, 80].

5.6.2. Reação em Cadeia da Polimerase

O método de amplificação do DNA através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utiliza iniciadores (*primers*) que são selecionados de modo a amplificar regiões selecionadas do genoma. A técnica de PCR permite a detecção de genes específicos responsáveis pela produção das MBLs e das OXAs [10, 32, 39, 59, 79, 81].

5.7. Métodos de Tipagem Molecular

Os métodos de tipagem são fundamentais para o entendimento da epidemiologia dos surtos, pois estabelecem o grau de similaridade entre diferentes isolados clínicos auxiliando na detecção de surtos, na identificação de transmissão cruzada e de fontes de infecção, bem como no monitoramento e controle da infecção hospitalar [82, 83].

O papel da tipagem molecular é determinar se organismos epidemiologicamente relacionados são também geneticamente relacionados [82]. Em geral cepas com 100% de similaridade genética são consideradas indistinguíveis e cepas com mais de 80% de similaridade genética são consideradas relacionadas e as cepas com similaridade genética menor a 80% são consideradas distintas [82]. Isolados que fazem parte de um surto podem ser indistinguíveis ou não, dependendo do número de ocorrências de eventos genéticos ao longo do tempo. Em geral, a ocorrência de eventos genéticos pode provocar uma alteração ou mutação em uma determinada região de DNA, modificando o perfil molecular do isolado [82]. Esses eventos genéticos podem ocorrer imprevisivelmente mesmo no intervalo de tempo de um surto bem caracterizado (de 1 a 3 meses) [83].

Existem métodos de tipagem fenotípica e genotípica, que podem ser caracterizados conforme sua reprodutibilidade, poder discriminatório e facilidade de execução [82]. Os métodos fenotípicos avaliam as características expressas pela bactéria, enquanto que os genotípicos baseiam-se na análise molecular. De um modo geral os métodos fenotípicos são menos adequados na tipagem bacteriana devido à capacidade que possuem de expressar características diferentes mesmo quando se trata de um único clone. Logo, os métodos genotípicos são melhores, pois apresentam maior poder discriminatório [82].

Durante as últimas décadas, métodos tradicionais de tipagem como fagotipagem e sorotipagem foram aprimorados ou substituídos por métodos moleculares como *fingerprinting* de plasmídeo, ribotipagem, métodos baseados em PCR (RFLP, RAPD, REP-PCR) e análises de padrões de restrição de DNA como a técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) [82].

5.7.1. *Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE

As técnicas genotípicas mais empregadas baseiam-se na clivagem do DNA por enzimas denominadas endonucleases de restrição. Devido à alta especificidade dessas enzimas, a digestão do DNA fornece um padrão de fragmentos idêntico ou muito semelhante para todos os isolados do mesmo clone. O número e o tamanho dos fragmentos de DNA gerados a partir da clivagem com endonucleases de restrição dependem do sítio de ação da enzima. Endonucleases de alta frequência produzem muitos fragmentos de baixo peso molecular gerando um perfil complexo e de difícil interpretação. Já, as de baixa frequência, geram um número menor de fragmentos com alto peso molecular facilitando a interpretação, mas omitindo pequenas diferenças [82].

Após a digestão, os fragmentos são separados por eletroforese. Fragmentos de baixo peso molecular podem ser separados por eletroforese convencional, mas fragmentos de tamanho superior a 50 Kb necessitam de um campo elétrico

alternado para serem separados. Na técnica que se denomina eletroforese pulsada (PFGE) os fragmentos migram continuamente, mas sofrem reorientação na direção de migração a cada mudança no campo elétrico, o que proporciona a identificação das bandas [84]. Desde que foi introduzida por Schwartz e colaboradores, esta técnica tem sido usada para separar moléculas maiores de 12 Mb. O intervalo de tempo em que o campo elétrico se mantém numa mesma direção é denominado tempo de pulso e sua duração é o fator mais importante na determinação do tamanho molecular que é possível separar [85]. Através da análise do perfil de macrorestrição do DNA utilizando a PFGE, é possível determinar o grau de similaridade entre os isolados de *A. baumannii*. A análise do padrão de bandas pode ser feita através da análise visual da fotografia do gel ou da aquisição da imagem e posterior comparação utilizando “software” que fornece o percentual de similaridade [86, 87].

O uso de software tem a vantagem de poder analisar um grande número de isolados e armazenar essa informação em um banco de dados para análises posteriores. Esses softwares permitem a construção de um dendrograma através do método de agrupamento usando a média aritmética não-ponderada (UPGMA) e é a representação visual da similaridade entre os isolados e da relação genética entre os diferentes grupos clonais [82]. Para calcular a similaridade entre os isolados, utilizamos coeficientes matemáticos que levam em conta a presença e ausência de bandas (por exemplo, coeficiente de Dice e Jaccard).

A técnica de macrorestrição do DNA seguido por PFGE supriu a necessidade que existia de uma técnica que pudesse ser utilizada para analisar um grande número de espécies bacterianas diferentes [86], sendo considerado o método mais reprodutível e de maior poder discriminatório, considerado portanto como padrão-ouro para tipagem molecular [82]. Atualmente técnicas de seqüenciamento como *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) também tem sido utilizadas para tipagem devido à facilidade e rapidez de execução com a vantagem de poder realizar uma análise evolutiva da espécie em estudo, pois

permite comparar resultados obtidos em diferentes instituições e em períodos diferentes [88].

Muitos estudos tem utilizado a técnica de PFGE durante a investigação epidemiológica de surtos causados por CRAB e também para definir a relação genética entre isolados provenientes de diferentes cidades e países [11, 63, 89-95].

5.7.2. Métodos de Tipagem Molecular Baseados em PCR

Alguns métodos de tipagem baseados na técnica de PCR têm sido utilizados para definir a relação genética entre isolados de *Acinetobacter* spp. Estes métodos possuem as vantagens de não necessitarem de equipamentos especiais, praticidade na execução, menor custo e rapidez de resultados. Entretanto, o poder discriminatório menor e a menor reprodutibilidade quando comparados a técnica de PFGE são normalmente os fatores limitantes [1, 82].

ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*), AP-PCR (*arbitrarily primed*) e REP-PCR (*repetitive extragenic palindromic sequence*) têm sido os métodos baseados em PCR mais utilizados para tipagem molecular de *Acinetobacter* sp. Todos esses métodos baseiam-se no mesmo princípio: o uso de um ou mais *primers* capazes de amplificar regiões repetidas no DNA bacteriano. A diferença está em qual região será amplificada que será definida pela escolha dos *primers* [82, 84, 96].

Em 2005 um estudo realizado na Índia comparou os resultados de tipagem molecular obtidos com AP-PCR e PFGE. Neste trabalho, os autores observaram que apesar de possuir um poder discriminatório menor do que o PFGE, principalmente para diferenciar os subtipos de um mesmo clone, o AP-PCR foi útil para diferenciar entre as cepas envolvidas nos surtos daquelas não relacionadas [97].

O REP-PCR tem sido utilizado como uma boa alternativa para a tipagem de *A. baumannii* [98]. Em estudo realizado em 2005, Huys e colaboradores, conseguiram caracterizar a disseminação do clone III “pan-european” (proveniente de isolados de *A. baumannii* multirresistentes) entre diferentes países da Europa e observaram a permanência deste clone nos hospitais europeus por mais de 8 anos [99].

Durante a investigação de um surto em Madri, Bou e colaboradores compararam os resultados do AP-PCR, REP-PCR e PFGE na definição da relação genética entre isolados obtidos antes, durante e após o surto. Os autores constataram a presença de oito diferentes grupos por REP-PCR e PFGE e somente 7 grupos por AP-PCR. Assim, o REP-PCR mostrou-se mais discriminatório que o AP-PCR quando comparado ao PFGE [100] e alguns estudos tem citado que o REP-PCR é mais discriminatório que os outros métodos de tipagem baseados em PCR [96, 101, 102].

5.7.3. Outros Métodos de Tipagem Molecular

Outros métodos como Ribotipagem, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) e VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) também tem sido usados para tipagem molecular de *Acinetobacter* sp. [1, 82].

Na ribotipagem o DNA bacteriano é clivado com uma enzima de restrição e após eletroforese é hibridizado com uma sonda complementar ao rRNA. Essa técnica possui um poder discriminatório menor do que o PFGE e é mais trabalhosa do que outros métodos, como os baseados em PCR. Quando automatizada, torna-se menos trabalhosa e os resultados são obtidos mais rapidamente, entretanto o custo torna-se muito elevado [1].

Landman e colaboradores compararam a ribotipagem com o PFGE, o MLST e o REP-PCR para tipagem de cepas endêmicas de *A. baumannii* em Nova Iorque.

Neste trabalho, observaram que a ribotipagem foi à técnica com o menor poder discriminatório entre as testadas [94].

O AFLP baseia-se na digestão prévia do DNA com uma enzima de restrição e posterior amplificação de fragmentos selecionados. Este método tem as vantagens de poder analisar um número considerável de amostras ao mesmo tempo, fácil e rápida execução apesar de possuir uma baixa reprodutibilidade. Além disso, a difícil interpretação requer uma grande experiência do analista [1].

O MLST baseia-se na avaliação da seqüência de diferentes genes chamados de *housekeeping* que são normalmente conservados dentro de uma espécie. Para *Acinetobacter* sp. alguns estudos tem utilizado este método e bons resultados têm sido obtidos quando comparados com PFGE [94, 103]. Este método tem a vantagem de ser altamente reprodutível podendo ser utilizado para estudos de epidemiologia global para monitorar a disseminação de cepas endêmicas e epidêmicas [1]. Entretanto é um método oneroso devido à necessidade de seqüenciamento de vários genes para cada isolado [94] e, portanto, pouco aplicável à tipagem de um número significativo de isolados [1].

O VNTR baseia-se na avaliação de diferentes *locus* gênicos através do número de repetições e da seqüência de cada *locus* avaliado [104]. Parece promissor quando comparado ao PFGE, mas a distinção entre cepas está diretamente relacionada aos *locus* selecionados para a análise [104]. Como depende de seqüenciamento é um método oneroso e poucos estudos usando este método para tipagem de *Acinetobacter* sp. têm sido publicados até o momento.

Algumas alternativas a esses métodos tais como multiplex PCR de genes específicos ou MLST associado à espectrometria de massas também tem sido mencionados em alguns estudos [1, 105].

5.8. Epidemiologia das Infecções causadas por *A. baumannii*

A. baumannii é considerado um patógeno oportunista e por isso raramente causa infecções comunitárias. Em geral, acomete pacientes hospitalizados que foram submetidos a procedimentos invasivos ou pacientes imunodeprimidos tais como aidéticos, transplantados e em uso de antineoplásicos [106, 107].

Poucos estudos relatam infecções por *A. baumannii* adquiridas na comunidade. Os estudos que descrevem casos de pneumonia comunitária causada por este microrganismo, normalmente associam a doença a algumas características dos pacientes tais como: alcoólatras, fumantes, diabéticos, pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) entre outras [3, 106].

Como patógeno nosocomial as principais doenças são a pneumonia associada à ventilação mecânica, bacteremias, meningites e infecções urinárias [107, 108]. Além disso, pacientes politraumatizados têm sido alvo de especial atenção. Diversos casos de osteomielite e infecção de sítio cirúrgico têm sido reportados em soldados repatriados da guerra do Iraque [13, 93]. Durante a guerra do Vietnã, *A. baumannii* foi o BGN mais prevalente nas lesões traumáticas de extremidades [109]. Caso semelhante também foi relatado em Bali após uma operação militar [110].

O impacto clínico dessas infecções é facilmente percebido já que os pacientes ficam mais tempo hospitalizados, utilizando antimicrobianos de amplo espectro e muitas vezes em unidades de isolamento [3, 107]. O aumento no tempo de internação pode estar associado ao sítio da infecção e ao perfil de susceptibilidade do microrganismo [111]. Nos Estados Unidos, estima-se que 88.000 óbitos por ano estejam associados às infecções nosocomiais causadas por diferentes microrganismos, a um custo de 4.5 bilhões de dólares para o sistema de saúde [82].

Poucos estudos recentes abordam a questão da prevalência de infecções nosocomiais por CRAb. Asensio e colaboradores encontraram uma prevalência variável de infecções causadas por CRAb na Espanha entre 1999 e 2005, sendo que a maior taxa no período foi de 38,7%. Neste estudo, o sexo (masculino), exposição a procedimentos invasivos e a presença de úlceras de pressão foram os fatores de risco que estatisticamente contribuíram para essas infecções [112]. Além disso, taxas maiores de resistência foram encontradas nas UTIs e nos hospitais de médio e grande porte.

Alguns estudos de caso-controle têm sido realizados com o objetivo de avaliar entre outros fatores, o impacto da mortalidade das infecções por *A. baumannii* em pacientes hospitalizados. Entretanto, a taxa de mortalidade atribuída a essas infecções é difícil de medir. Os pacientes apresentam diversas comorbidades que podem causar um viés na análise [1, 111, 113].

Em 2006, Falagas e colaboradores evidenciaram em uma revisão sistemática que a mortalidade de pacientes com infecção por *A. baumannii* era independente das comorbidades [114]. Entretanto em 2007, Abbo e colaboradores não encontraram associação independente entre o aumento da mortalidade e a ocorrência de infecção por *A. baumannii* [115].

Uma revisão sistemática demonstrou que a mortalidade de pacientes com pneumonia e/ou bacteremia comunitária por *Acinetobacter* sp. está em torno de 56%. Neste estudo também foi evidenciado que os casos foram originados da China, Taiwan e Austrália [106]. Os isolados eram em geral sensíveis aos antimicrobianos utilizados na terapêutica.

Cabe ressaltar que a discordância entre os diferentes estudos pode estar associada ao delineamento epidemiológico, as características da população estudada e ao tamanho da amostra [111].

5.8.1. Fatores de Risco das Infecções por CRAb

Os fatores de risco que predispõe um paciente para infecção por CRAb não são distintos dos demais microrganismos MDR. Pacientes multi-invadidos que fazem uso de cateter venoso central, sonda vesical, ventilação mecânica e que realizaram procedimento cirúrgico, são os mais acometidos [3, 91, 107, 108, 116]. Além disso, tempo de hospitalização, principalmente na UTI e o uso prévio de antimicrobianos também têm sido associados [107, 108]. Um resumo dos fatores de risco pode ser visualizado na figura 1.

5.8.2. Características dos Surtos

A incidência de casos de infecção nosocomial devido a CRAb pode ser atribuída a sua capacidade em causar surtos. Uma das principais características deste microrganismo é sua capacidade de sobreviver em superfícies inanimadas, mesmo na ausência de umidade, por longos períodos de tempo [3, 91, 111, 113]. A capacidade de formar biofilme, de penetrar nas células epiteliais e de se ligar as mucinas salivares está associada com a facilidade que algumas cepas possuem para colonizar pacientes e equipamentos hospitalares e posteriormente ocasionarem surtos [3, 14].

O ambiente ao redor do leito do paciente parece ser a fonte ambiental mais importante de transmissão do microrganismo. Assim, a contaminação do ambiente hospitalar e a transmissão entre pacientes mediada pelos profissionais de saúde e pelos equipamentos médicos têm um papel importantíssimo na disseminação do microrganismo [3, 11, 107, 117].

Os surtos de CRAb têm ocorrido em diferentes unidades hospitalares: internação clínica, internação cirúrgica, UTI neonatal, politraumatizados e UTI adulto. A maior parte dos relatos ocorreu em UTI de adultos em pacientes com mais de 50 anos [45, 91, 109, 118, 119].

Alguns estudos relatam que determinadas cepas epidêmicas de CRAB têm sido isoladas de swab da pele e swab retal de pacientes, durante períodos de surto [120-122]. Esse fato relaciona a importância da colonização de pacientes com a disseminação do microrganismo. Além disso, a disseminação de CRAB entre as diferentes instituições, também têm sido atribuída a transferência de pacientes colonizados [109].

O contexto epidemiológico-molecular dos surtos de CRAB é bastante complexo. Alguns autores descreveram surtos monoclonais associados a um determinante de resistência, enquanto outros descreveram surtos policlonais [21, 45-47, 57, 92, 123].

Valenzuela e colaboradores caracterizaram a transferência horizontal de elementos genéticos móveis em um surto policlonal na Holanda. Neste estudo os autores relataram a presença de elementos genéticos comuns tais como *bla*_{OXA-23}, *ISAba1* e cassetes gênicos em clones diferentes co-circulantes, sugerindo a transferência horizontal. Neste estudo, os autores identificaram que ao longo dos 4 anos houveram “mini-surtos” de cepas epidêmicas e cepas esporádicas ocorrendo ao mesmo tempo [51].

5.8.3. Relatos de Surtos

Numerosos relatos de surtos causados por CRAB têm sido publicados nos últimos anos em diversos países.

Em 2000, Bou e colaboradores investigaram um surto em Madri, Espanha. Neste estudo os autores observaram que todos os isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos foram produtores da enzima OXA-24 e pertenciam a um mesmo clone. Isolados coletados antes, durante e após o surto, sensíveis aos carbapenêmicos, não continham o gene *bla*_{OXA-24} e pertenciam a distintos grupos clonais [62].

Na Europa, alguns trabalhos têm associado os surtos à disseminação dos três clones europeus (*European clone* (EU) I, II e III) em vários países. Enoch e colaboradores descreveram um surto com duração de seis meses em Cambridge [121]. Neste trabalho, 16 casos ocorreram na unidade de cuidados críticos de pacientes neurológicos e três casos ocorreram na UTI. O caso índice ocorreu em um paciente transplantado que estava fazendo diálise em equipamento compartilhado com o segundo caso. A maioria dos pacientes era do sexo masculino e a média de idade foi de 52 anos. Este surto foi caracterizado como monoclonal e causado pelo *European clone I*.

Na Holanda foi realizado um estudo avaliando múltiplos surtos de *Acinetobacter* sp. ocorridos entre 1999-2001. Os autores avaliaram pelo menos 3 amostras de cada um dos oito hospitais, que foram coletadas em diferentes períodos do surto. O número de pacientes afetados variou de 6 a 66 e os surtos duraram de 2 a 22 meses entre os diferentes hospitais. Em sete hospitais *A. baumannii* foi a espécie responsável pelo surto e em 1 hospital, a genoespécie 13TU é a que estava envolvida. Quatro diferentes clones de *A. baumannii* foram identificados e houve disseminação de um mesmo clone entre diferentes hospitais [11]. Duas diferentes cepas foram associadas ao EU II e III, já identificados também na República Tcheca, nordeste da Europa, Espanha, Bélgica e França [90, 124].

Um trabalho realizado na Itália relatou um surto de dois meses em uma UTI de um hospital em Roma [125]. Foram isoladas 57 amostras de *A. baumannii* provenientes de 14 pacientes. A maioria dos isolados foi do trato respiratório inferior e 10 pacientes desenvolveram VAP. Todos os isolados apresentaram CIM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ para o imipenem. Isolados coletados do ambiente e das mãos de profissionais de saúde apresentaram o mesmo perfil de susceptibilidade ao imipenem e na tipagem molecular foi evidenciada a presença de um clone único tanto nos isolados clínicos quanto nos isolados do ambiente. Outro estudo realizado na Itália relacionou o aumento da resistência aos carbapenêmicos e a

ocorrência de surtos à presença do gene *bla*_{oxa-58} tanto em isolados de pacientes infectados como colonizados [126].

Em Taiwan, um surto causado por *A. baumannii* resistente a todos os antimicrobianos testados (PAN-R) em dois diferentes hospitais, foi investigado para definir a relação genética entre os isolados. Neste estudo, os autores constataram 3 diferentes grupos clonais de *A. baumannii* PAN-R, presentes em ambos os hospitais e provenientes tanto do ambiente hospitalar quanto de material clínico dos pacientes. Observaram também, que isolados MDR foram geneticamente relacionados a isolados PAN-R, indicando a emergência de resistência sob pressão seletiva de antimicrobianos [127].

Outra descrição importante de surto por CRAb é o caso da cidade de Nova Iorque. O primeiro episódio de surto foi relatado no início dos anos 90 em apenas 1 hospital [128]. No final dos anos 90, doze hospitais relataram surtos de CRAb com duração de 1 a 3 meses, principalmente nas UTI's [129]. Manikal e colaboradores (2000) avaliaram cepas provenientes de diferentes hospitais isoladas no período de surto e constataram elevados níveis de resistência na maioria das instituições e disseminação de um mesmo clone entre diferentes hospitais [95]. Além disso, o uso de cefalosporinas foi fortemente associado à ocorrência de surtos nesta região [89]. Posteriormente, outros surtos também foram relatados em diferentes regiões nos Estados Unidos [130, 131].

O primeiro relato de surto causado por CRAb no Brasil, ocorreu em 2003 na cidade de Curitiba. Neste estudo, foram avaliados 11 isolados procedentes de dois hospitais diferentes no ano de 1999. Todos os pacientes foram submetidos à VAP e apesar do uso de diferentes terapias antimicrobianas, cinco foram a óbito. A presença de MBL e OXA foi pesquisada e oito isolados foram positivos para o gene *bla*_{OXA-23}. Através de métodos de tipagem, os autores constataram que o surto foi monoclonal e houve disseminação entre os hospitais [45].

Na cidade de Porto Alegre, o primeiro caso de CRAb ocorreu em 2004 em um hospital isoladamente [47]. Em 2007 houve então um “grande surto” envolvendo

diversos hospitais da cidade e culminou com o fechamento de pelo menos três UTIs. Nosso grupo de pesquisa investigou esses isolados provenientes de dois hospitais e constatamos a presença do gene *bla*_{OXA-23-like} bem como a disseminação interinstitucional de um mesmo clone e a disseminação de um clone comum presente em equipamentos médicos e causando infecção em pacientes [47].

5.9. Disseminação Global de CRAB

A disseminação de cepas CRAB têm sido relatada em diferentes países. Provavelmente o caso melhor descrito seja a disseminação internacional dos três clones europeus (EUI, II e III) que já foram relatados em diversas regiões do continente [1, 92]. Inicialmente foi constatada a disseminação de um clone *A. baumannii* MDR em 24 hospitais do Reino Unido, mas não estava associado à produção de carbapenemases (MBL e OXA) [132]. Posteriormente, através de métodos de tipagem, foi verificada a disseminação de outros dois clones em diferentes países da Europa, porém a maioria dos isolados era sensível aos carbapenêmicos [124]. Com a emergência da resistência aos carbapenêmicos estudos posteriores evidenciaram que isolados pertencentes a esses mesmos clones expressaram carbapenemases do tipo OXA [90, 99]. Inicialmente a relação genética entre esses isolados foi definida por AFLP com nível de similaridade superior a 80%. Posteriormente, esse dado foi confirmado por PFGE, ribotipagem e MLST. Entretanto, nenhuma relação epidemiológica de tempo e/ou espaço foi identificada entre os isolados de diferentes instituições [1].

Estudo recente identificou a presença dos clones EUI, II e III em diferentes países fora do continente Europeu, associados à expressão de oxacilinas. Nenhum isolado foi positivo para a pesquisa de MBL. Esses dados revelam o sucesso de algumas cepas de *A. baumannii* na aquisição de mecanismos de resistência e representam um importante desafio para os pacientes e profissionais de saúde [133].

O trabalho realizado com soldados repatriados da guerra do Iraque, demonstrou que os casos de infecção por CRAb estavam associados aos genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-58} pertencentes aos clones EUI e II [93]. Esses clones têm sido responsáveis por diferentes surtos e possuem uma grande capacidade adaptativa, sendo virulentos, MDR e de difícil controle. Em muitos hospitais já são considerados endêmicos [2].

Em 2006, Coelho e colaboradores identificaram dois novos clones de *A. baumannii* MDR disseminados em 48 hospitais da Inglaterra. Esses clones eram resistentes aos carbapenêmicos e foram associados à enzima OXA-23 e ao elemento de inserção *ISAbal1* [92].

Em 2008, Nemec e colaboradores associaram a emergência de CRAb na República Tcheca, à disseminação do clone EU11. Dos 105 isolados avaliados, 66 foram alocados dentro deste grupo. A CIM para os carbapenêmicos foi variável dentro deste grupo e CIM mais elevadas foram associadas a ocorrência do elemento *ISAbal1*. Outros determinantes de resistência também foram identificados neste grupo clonal [90].

Em outro estudo, foi avaliada a disseminação de OXA-58 em três continentes. Os autores avaliaram 30 isolados de *A. baumannii-calcoaceticus* não susceptíveis à carbapenêmicos, procedentes da Argentina, Kuwait e Reino Unido. Todos os isolados foram positivos para o gene *bla*_{OXA-58}. Sete diferentes grupos clonais foram identificados por PFGE e os isolados da Argentina e do Kuwait não foram geneticamente relacionados aos isolados do Reino Unido [134].

Em relato do SENTRY no ano de 2009 foi constatada a disseminação de *Acinetobacter* spp. associado às β -lactamases da classe D em diferentes países da região Ásia-Pacífico [57]. Dos 230 isolados resistentes aos carbapenêmicos, apenas 2 foram positivos para MBL (IMP-4 e VIM-2) e 162 foram positivos para OXA. A enzima OXA-23 foi a mais prevalente entre esses isolados e foi identificada em seis países diferentes. A disseminação clonal de isolados não relacionados epidemiologicamente (procedente de diferentes países) foi

constatada por PFGE e Ribotipagem e durante o período do estudo, doze diferentes grupos clonais (todos OXA-23 positivos) foram identificados.

O primeiro relato de disseminação de OXA-23 na América Latina ocorreu na Colômbia. Villegas e colaboradores avaliaram isolados provenientes de dez diferentes hospitais do país coletados no ano de 2005. Constataram a presença de mais de 20 diferentes grupos clonais, sendo 4 mais prevalentes. Através da técnica de PFGE este estudo evidenciou a disseminação clonal entre hospitais da mesma cidade e entre hospitais de cidades diferentes [123].

No Brasil, poucos trabalhos investigando a disseminação de CRAb têm sido publicados. Estudo realizado na cidade de São Paulo, avaliou 73 isolados de CRAb coletados entre 1993 e 2001 de um único hospital. Os autores observaram um aumento na prevalência do gene *bla*_{IMP-1} que variou de 0% em 1993 a 100% no período de 1999-2001. Na ribotipagem foram identificados 20 ribogrupos diferentes, sendo que dois destes foram os mais prevalentes [39].

Em contrapartida, um estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro, não identificou nenhum isolado positivo para os genes de MBL pesquisados, mas 87,3% dos isolados foram positivos para *bla*_{oxa-23}. Este estudo avaliou isolados de CRAb de oito diferentes hospitais entre 2006 e 2007. Os isolados foram separados em cinco diferentes grupos clonais por PFGE sendo que dois deles foram os mais prevalentes e ambos encontrados em diferentes hospitais [46].

5.10. Medidas de Controle de Infecção

As infecções nosocomiais podem ser endêmicas, epidêmicas ou esporádicas. Normalmente as infecções endêmicas são o principal alvo de atuação dos serviços de controle de infecção. As infecções epidêmicas são definidas pela ocorrência de uma taxa de infecção estatisticamente maior quando comparada com a taxa de infecção histórica da instituição [82].

O manejo de surtos causados por CRAB não é muito diferente para os demais microrganismos MDR. A primeira questão a ser investigada em um surto é a existência de uma fonte comum de disseminação do patógeno.

Como a epidemiologia dos surtos causados por CRAB é bastante complexa, algumas medidas especiais precisam ser tomadas [2]. O principal aspecto a ser avaliado e intensificado é a higienização do ambiente. Soluções desinfetantes devem ser utilizadas de modo adequado (tempo e concentração) para que haja efetividade no processo e evite a seleção de cepas resistentes [91].

Além do ambiente, os equipamentos médicos também necessitam de atenção especial durante os processos de higienização e esterilização [11]. É importante ainda, procurar utilizar sistemas de sucção fechados para evitar a contaminação do ambiente com aerossóis contendo o microrganismo. A adesão dos profissionais de saúde a essas medidas, associado à higienização de mãos e ao uso de precauções de contato, têm demonstrado um grande impacto no gerenciamento destes surtos [3, 113, 116, 121, 135]. Em algumas situações, principalmente durante surtos, não é possível isolar todos os pacientes colonizados e infectados. Diante este fato, pode-se ainda adotar o agrupamento em *coorte* onde ficarão somente os pacientes portadores do microrganismo com profissionais exclusivos para os cuidados destes pacientes [111, 113].

Culturas de vigilância têm sido utilizadas como alternativa na identificação precoce de pacientes colonizados. Entretanto, a literatura demonstra resultados contraditórios quando se mede a relação custo-benefício desta prática [107, 113].

Em 2006, Furtado e colaboradores avaliaram a prevalência de culturas positivas de *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* após a implantação de um programa de culturas de vigilância. Os autores observaram que associada a outras medidas, a prática é importante na definição dos pacientes que deverão ser isolados e submetidos às precauções de contato [122].

Em 2007, Marchaim e colaboradores avaliaram a sensibilidade da cultura de vigilância para detectar pacientes colonizados por *A. baumannii* MDR. Diferente do que é observado para *S. aureus* e *Enterococcus* sp., a sensibilidade da cultura de vigilância para *A. baumannii* MDR foi muito baixa. Quando a coleta é realizada em apenas um sítio, os autores tiveram 30% de sensibilidade e quando a coleta foi realizada em múltiplos sítios, a sensibilidade chegou a 55% [136]. Assim, medidas rigorosas de controle de infecção e a pesquisa de cepas epidêmicas podem ter melhores resultados em prevenir ou diminuir a disseminação de CRAb.

Em 2009, Morgan e colaboradores avaliaram as diferentes medidas de controle de infecção adotadas por 11 diferentes hospitais de Nova Iorque dez anos após os primeiros surtos serem relatados. As taxas de infecção nas UTIs destes hospitais variaram entre 0.51-4.9 isolados/1000 leitos-dia. Não houve diferença estatística significativa entre as taxas de hospitais que usaram as medidas de precaução de contato quando comparadas com aqueles que não usaram. Os autores relatam a falta de padronização na definição de multiresistência e a variedade de práticas de controle de infecção adotadas entre os hospitais como sendo a principal observação do estudo [129].

O gerenciamento do uso de antimicrobianos também é fundamental para evitar surtos por MDR. A emergência de CRAb ocorre normalmente associada a pressão seletiva do uso prolongado de fluorquinolonas, carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro [1, 111, 113]. Um estudo associou a emergência e persistência de CRAb ao uso indiscriminado de fluorquinolonas [119]. Entretanto, mais estudos são necessários para o esclarecimento do real impacto da pressão seletiva de antimicrobianos na seleção de CRAb.

O último aspecto, mas de grande importância no gerenciamento de surtos, atribui-se as questões administrativas. Condições de trabalho adequadas, recursos humanos capacitados e qualificados e política de gerenciamento do uso de antimicrobianos são essenciais para que medidas efetivas de controle de infecção possam ser implantadas [111, 113].

Vigilância epidemiológica ativa deve ser realizada para avaliar a efetividade das medidas e a eficácia da terapia antimicrobiana usada [82]. Um resumo dos principais fatores atenuantes e agravantes para a emergência e disseminação de CRAB são apresentados na figura 4 [111] .

5.11. Tratamento das Infecções

O tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* é baseado em estudos observacionais retrospectivos, série de casos e dados *in vitro*. Não há na literatura, ensaios clínicos controlados que tenham avaliado o uso de antimicrobianos no tratamento destas infecções [3]. Fluorquinolonas, carbapenêmicos e sulbactam são normalmente os fármacos de escolha para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, desde que o isolado seja susceptível nos testes laboratoriais [2, 3, 111, 113].

Sulbactam mantém-se ativo *in vitro* contra a maioria dos isolados e tem sido usado com sucesso em pneumonias associadas à ventilação mecânica e meningites, entretanto a baixa reprodutibilidade dos testes *in vitro*, aumenta a insegurança do uso deste antimicrobiano no tratamento de infecções graves [3, 137].

Os carbapenêmicos são os fármacos β -lactâmicos de maior espectro e considerados como a melhor opção terapêutica no tratamento de infecções graves por *A. baumannii* [23, 27]. Estas moléculas foram originadas a partir de compostos naturais presentes no solo e assim é possível entender que microrganismos presentes no solo teriam a capacidade de degradar esses compostos para sobreviverem [24]. Deste modo, a seleção e a indução de fenótipos de resistência aos carbapenêmicos limitam muito as opções terapêuticas.

A resistência aos carbapenêmicos que tem se disseminado amplamente pelos hospitais em diferentes países, têm reduzido significativamente as alternativas de

tratamento destas infecções [3], pois a maioria dos isolados que expressam resistência aos carbapenêmicos também são resistentes a praticamente todas as outras classes de antimicrobianos.

Falhas terapêuticas durante o tratamento com carbapenêmicos podem estar associadas a fenótipos de heteroresistência. A heteroresistência é definida como uma subpopulação resistente dentro de uma população sensível. Essa subpopulação resistente pode ser detectada pela presença de colônias dentro do halo de inibição do crescimento (quando se usa fitas para determinação da CIM ou disco-difusão) ou pelo crescimento na presença do antimicrobiano (quando se usa a difusão em Agar) [138, 139].

Dois estudos relacionados à heteroresistência em CRAB demonstraram que essa subpopulação pode estar associada a mecanismos de indução do fenótipo de resistência na presença de carbapenêmicos o que poderia levar a falha terapêutica. Entretanto, esse é um tema ainda pouco estudado em CRAB [138, 139].

Devido as dificuldades no tratamento de infecções por CRAB, o uso das polimixinas aumentou nos últimos anos. As polimixinas atuam desestabilizando a membrana celular bacteriana levando a morte celular. Este efeito é concentração dependente. O sucesso destes fármacos para tratar pneumonia associada à ventilação mecânica, principalmente pela via parenteral tem sido relatado [140]. O grande problema associado à nefrotoxicidade tem sido desmistificado já que este efeito parece ser bem controlado quando o fármaco é administrado em doses adequadas [141, 142].

Além de alguns casos de resistência a polimixina já terem sido relatados, a heteroresistência já relatada durante a monoterapia parece ser um problema preocupante [76]. Owen e colaboradores observaram o fenótipo de heteroresistência e sugerem que a terapia combinada poderia evitar a emergência de resistência durante o tratamento [143].

A tigeciclina, uma glicilciclina, tem sido usada no tratamento de infecções causadas por CRAb. A tigeciclina é derivada da minociclina e é o primeiro agente disponível comercialmente desta nova classe. Possui atividade bacteriostática e é capaz de evitar mecanismos de resistência comuns às outras tetraciclinas. Entretanto, relato de resistência tem associado o mecanismo à expressão de bombas de efluxo do tipo RND [144].

Os estudos sobre a eficácia da tigeciclina contra infecções por CRAb são controversos. Alguns estudos relatam bons resultados contra pneumonia associada à ventilação mecânica e bacteremias [145, 146]. Entretanto, Anthony e colaboradores relataram falha terapêutica em alguns casos de bacteremia [147]. Assim, mais estudos são necessários para que a eficácia da tigeciclina contra infecções por CRAb possa ser melhor elucidada.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo Geral

Avaliar o perfil epidemiológico e molecular de amostras de *Acinetobacter* sp. resistentes aos carbapenêmicos, isoladas na cidade de Porto Alegre.

6.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar o perfil epidemiológico de amostras de *Acinetobacter* sp. resistentes aos carbapenêmicos, isoladas de pacientes infectados/colonizados entre 2007 e 2008 em hospitais da cidade de Porto Alegre
2. Identificar a possível presença de metalo- β -lactamases (SPM-1, VIM-2, IMP-1) nas amostras em estudo
3. Avaliar a emergência e a disseminação dos isolados de *Acinetobacter baumannii* produtores de metalo- β -lactamase entre os hospitais da cidade de Porto Alegre
4. Identificar a possível presença de oxacilinases (OXA-23, OXA-24, OXA-58) nas amostras em estudo
5. Avaliar a disseminação clonal entre as amostras isoladas do meio ambiente e as amostras isoladas de pacientes infectados/colonizados por *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos no período do estudo
6. Avaliar a disseminação clonal entre as amostras isoladas de pacientes infectados/colonizados por *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, entre os hospitais da cidade de Porto Alegre, no período do estudo

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL: ***Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen.** *Clin Microbiol Rev* 2008, **21**(3):538-582.
2. Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K: ***Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health?** *Int J Antimicrob Agents* 2008, **32**(2):106-119.
3. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H: **An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Nat Rev Microbiol* 2007, **5**(12):939-951.
4. Livermore DM: **beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance.** *Clin Microbiol Rev* 1995, **8**(4):557-584.
5. Poirel L, Nordmann P: **Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology.** *Clin Microbiol Infect* 2006, **12**(9):826-836.
6. Bouvet PJM, Grimont PAD: **Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwofii*.** *Int J Syst Bacteriol* 1986, **36**(2):228-240.
7. Tjernberg I, Ursing J: **Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization.** *APMIS* 1989, **97**(7):595-605.
8. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J: **Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species.** *J Clin Microbiol* 1991, **29**(2):277-282.
9. Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P: **Characterization of the naturally occurring oxacillinase of**

- Acinetobacter baumannii***. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(10):4174-4179.
10. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM: **Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp.** *Int J Antimicrob Agents* 2006, **27**(4):351-353.
 11. Bernards AT, Harinck HI, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ, van den Broek PJ: **Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004, **25**(11):1002-1004.
 12. Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C, Pennisi C, Agodi A: **Acquisition and spread of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* in intensive care patients.** *Int J Hyg Environ Health* 2009, **212**(3):330-337.
 13. Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ: **Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**(8):1218-1224.
 14. Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT: **Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces.** *Clin Microbiol Infect* 2008, **14**(1):49-54.
 15. Rodriguez-Bano J, Marti S, Soto S, Fernandez-Cuenca F, Cisneros JM, Pachon J, Pascual A, Martinez-Martinez L, McQueary C, Actis LA *et al*: **Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications.** *Clin Microbiol Infect* 2008, **14**(3):276-278.
 16. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, Tshimbalanga N, Akira S, van der Poll T: **Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **173**(1):122-129.

17. Livermore DM: **Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems.** *J Antimicrob Chemother* 2001, **47**(3):247-250.
18. Livermore DM, Brown DF: **Detection of beta-lactamase-mediated resistance.** *J Antimicrob Chemother* 2001, **48 Suppl 1**:59-64.
19. Forbes B, Sahan D, Weissfeld A: **Principles of antimicrobial action and resistance: Pseudomonas, Burkholderia and similar organisms.** In: *Diagnostic Microbiology.* Edited by Bailey, 10 edn. New York: Mosby; 1998: 448-461.
20. Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, Dossat C, Gas S, Kreimeyer A, Lenoble P *et al*: **Comparative analysis of Acinetobacters: three genomes for three lifestyles.** *PLoS One* 2008, **3**(3):e1805.
21. Mak JK, Kim MJ, Pham J, Tapsall J, White PA: **Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii.** *J Antimicrob Chemother* 2009, **63**(1):47-54.
22. Chambers H, Sande M: **Fármacos Antimicrobianos.** In: *Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica.* Edited by Hardman J, Limbird L, 9 edn. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana; 1996: 757-776.
23. Rasmussen BA, Bush K: **Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases.** *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **41**(2):223-232.
24. Queenan AM, Bush K: **Carbapenemases: the versatile beta-lactamases.** *Clin Microbiol Rev* 2007, **20**(3):440-458, table of contents.
25. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, Gales AC: **Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: resistance mechanisms and implications for therapy.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010, **8**(1):71-93.

26. Robledo IE, Aquino EE, Sante MI, Santana JL, Otero DM, Leon CF, Vazquez GJ: **Detection of KPC in *Acinetobacter* sp. in Puerto Rico.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009.
27. Livermore DM, Woodford N: **Carbapenemases: a problem in waiting?** *Curr Opin Microbiol* 2000, **3**(5):489-495.
28. Maltezou HC: **Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance?** *Int J Antimicrob Agents* 2009, **33**(5):405 e401-407.
29. Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T: **KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**(11):4194-4197.
30. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S: **Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrob Agents Chemother* 1991, **35**(1):147-151.
31. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM: **Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**(7):1584-1590.
32. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P: **Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**(4):891-897.
33. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P: **Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?** *Clin Microbiol Rev* 2005, **18**(2):306-325.
34. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR: **Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-**

- lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme.** *J Antimicrob Chemother* 2002, **50**(5):673-679.
35. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR: **Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**(12):4654-4661.
 36. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y: **Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(11):4485-4491.
 37. Yong DR, B.; Pratt, R.; Toleman, M.; Walsh, T.: **A novel sub-group metallo-b-lactamase (MBL), Aim-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (Psa) from Australia.** In: *47 th ICAAC*. vol. abstract C1-593. Chicago, USA: 47 th ICAAC, 2007; 2007: p. 75.
 38. Gupta V: **Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species.** *Expert Opin Investig Drugs* 2008, **17**(2):131-143.
 39. Tognim MC, Gales AC, Penteado AP, Silbert S, Sader HS: **Dissemination of IMP-1 metallo- beta -lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006, **27**(7):742-747.
 40. Walther-Rasmussen J, Hoiby N: **OXA-type carbapenemases.** *J Antimicrob Chemother* 2006, **57**(3):373-383.
 41. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG: **ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*.** *Int J Antimicrob Agents* 1993, **2**(2):81-87.
 42. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H: **OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in**

- Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(12):5035-5038.
43. Poirel L, Naas T, Nordmann P: **Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases**. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**(1):24-38.
 44. Walsh TR: **Clinically significant carbapenemases: an update**. *Curr Opin Infect Dis* 2008, **21**(4):367-371.
 45. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Penteadó-Filho SR, Livermore DM, Woodford N: **Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil**. *J Clin Microbiol* 2003, **41**(7):3403-3406.
 46. Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD: **Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil**. *Int J Antimicrob Agents* 2009, **34**(1):25-28.
 47. Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, Machado AB, Barth AL: **Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme: Dissemination in Southern Brazil**. *Infection* 2009.
 48. Girlich D, Poirel L, Nordmann P: **First isolation of the blaOXA-23 carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate**. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**(1):578-579.
 49. Heritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P: **Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii***. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(8):3198-3202.
 50. Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P: **Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-**

- 23** in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(4):1530-1533.
51. Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, van der Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell J: **Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii***. *J Clin Microbiol* 2007, **45**(2):453-460.
52. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL: **The role of ISAb₁ in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii***. *FEMS Microbiol Lett* 2006, **258**(1):72-77.
53. Segal H, Garny S, Elisha BG: **Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*?** *FEMS Microbiol Lett* 2005, **243**(2):425-429.
54. Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P: ***Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**(4):1252-1256.
55. Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL: **Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections.** *J Hosp Infect* 1999, **42**(3):201-204.
56. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Deshpande LM, Jones RN: **Codetection of blaOXA-23-like gene (blaOXA-133) and blaOXA-58 in *Acinetobacter radioresistens*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(2):843-844.
57. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN: **Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program.** *J Antimicrob Chemother* 2009, **63**(1):55-59.
58. Qi C, Malczynski M, Parker M, Scheetz MH: **Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical**

- strains collected from 2004 to 2007. *J Clin Microbiol* 2008, **46**(3):1106-1109.
59. Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y: **IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**(4):627-632.
60. Vila J, Marti S, Sanchez-Céspedes J: **Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**(6):1210-1215.
61. Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T: **Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**(9):3298-3304.
62. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J: **Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**(9):3299-3305.
63. Quale J, Bratu S, Landman D, Heddurshetti R: **Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City.** *Clin Infect Dis* 2003, **37**(2):214-220.
64. Sato K, Nakae T: **Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance.** *J Antimicrob Chemother* 1991, **28**(1):35-45.
65. Gribun A, Nitzan Y, Pechatnikov I, Hershkovits G, Katcoff DJ: **Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-**

- forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol* 2003, **47**(5):434-443.
66. Hong H, Patel DR, Tamm LK, van den Berg B: **The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel.** *J Biol Chem* 2006, **281**(11):7568-7577.
67. Dupont M, Pages JM, Lafitte D, Siroy A, Bollet C: **Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*.** *J Proteome Res* 2005, **4**(6):2386-2390.
68. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM: **Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(4):1432-1440.
69. Siroy A, Molle V, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ, Jouenne T, De E: **Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(12):4876-4883.
70. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A: **Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.** *J Antimicrob Chemother* 2003, **51**(3):565-574.
71. Siroy A, Cosette P, Seyer D, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Van Dorsselaer A, Boyer-Mariotte S, Jouenne T, De E: **Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain.** *J Proteome Res* 2006, **5**(12):3385-3398.

72. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L: **Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones.** *J Med Microbiol* 2004, **53**(Pt 12):1233-1240.
73. Doi Y, Adams JM, Yamane K, Paterson DL: **Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(11):4209-4210.
74. Hamouda A, Amyes SG: **Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin.** *J Antimicrob Chemother* 2004, **54**(3):695-696.
75. Ruzin A, Keeney D, Bradford PA: **AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**(5):1001-1004.
76. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, Liolios L: **Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**(9):2946-2950.
77. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M: **Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**(1):40-43.
78. Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A: **Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**(8):2755-2759.
79. Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL: **Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil.** *Infection* 2007, **35**(6):457-460.

80. Danel F, Paetzel M, Strynadka NC, Page MG: **Effect of divalent metal cations on the dimerization of OXA-10 and -14 class D beta-lactamases from *Pseudomonas aeruginosa***. *Biochemistry* 2001, **40**(31):9412-9420.
81. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, Kato N, Ohta M: **Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems**. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, **40**(2):349-353.
82. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ: **Application of molecular techniques to the study of hospital infection**. *Clin Microbiol Rev* 2006, **19**(3):512-530.
83. Sader HS, Pignatari AC, Leme IL, Burattini MN, Tancredi R, Hollis RJ, Jones RN: **Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit**. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993, **17**(1):13-18.
84. Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt TL: **Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa***. *J Clin Microbiol* 1995, **33**(3):528-534.
85. Schwartz DC, Cantor CR: **Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis**. *Cell* 1984, **37**(1):67-75.
86. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B: **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing**. *J Clin Microbiol* 1995, **33**(9):2233-2239.
87. Rementeria A, Gallego L, Quindos G, Garaizar J: **Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns**. *Clin Microbiol Infect* 2001, **7**(6):331-336.

88. Cooper JE, Feil EJ: **Multilocus sequence typing--what is resolved?** *Trends Microbiol* 2004, **12**(8):373-377.
89. Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, Vangala K, Ravishankar J, Flores C, Brooks S: **Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned.** *Arch Intern Med* 2002, **162**(13):1515-1520.
90. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Diancourt L, van der Reijden TJ, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L: **Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II.** *J Antimicrob Chemother* 2008, **62**(3):484-489.
91. van den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, De Brauwier E, Mascini EM, van der Reijden TJ, Spanjaard L, Thewessen EA, van der Zee A, van Zeijl JH *et al*: **Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001.** *Clin Microbiol Infect* 2006, **12**(9):837-843.
92. Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, Palepou MF, Pike R, Pitt TL, Patel BC *et al*: **Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**(10):3623-3627.
93. Turton JF, Kaufmann ME, Gill MJ, Pike R, Scott PT, Fishbain J, Craft D, Deye G, Riddell S, Lindler LE *et al*: **Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**(7):2630-2634.
94. Landman D, Butnariu M, Bratu S, Quale J: **Genetic relatedness of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City.** *Epidemiol Infect* 2009, **137**(2):174-180.

95. Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J: **Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage.** *Clin Infect Dis* 2000, **31**(1):101-106.
96. Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H, Vaneechoutte M: **Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp.** *J Clin Microbiol* 1997, **35**(12):3071-3077.
97. Prashanth K, Badrinath S: **Epidemiological investigation of nosocomial *Acinetobacter* infections using arbitrarily primed PCR & pulse field gel electrophoresis.** *Indian J Med Res* 2005, **122**(5):408-418.
98. Fontana C, Favaro M, Minelli S, Bossa MC, Testore GP, Leonardis F, Natoli S, Favalli C: ***Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates.** *BMC Infect Dis* 2008, **8**:79.
99. Huys G, Cnockaert M, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S, Vaneechoutte M, Swings J: **Repetitive-DNA-element PCR fingerprinting and antibiotic resistance of pan-European multi-resistant *Acinetobacter baumannii* clone III strains.** *J Med Microbiol* 2005, **54**(Pt 9):851-856.
100. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J: **PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Clin Microbiol Infect* 2000, **6**(12):635-643.
101. Vila J, Marcos MA, Jimenez de Anta MT: **A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex.** *J Med Microbiol* 1996, **44**(6):482-489.

102. Snelling AM, Gerner-Smidt P, Hawkey PM, Heritage J, Parnell P, Porter C, Bodenham AR, Inglis T: **Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak.** *J Clin Microbiol* 1996, **34**(5):1193-1202.
103. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodriguez-Valera F: **Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(9):4382-4390.
104. Turton JF, Matos J, Kaufmann ME, Pitt TL: **Variable number tandem repeat loci providing discrimination within widespread genotypes of *Acinetobacter baumannii*.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009, **28**(5):499-507.
105. Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL: **Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*.** *Clin Microbiol Infect* 2007, **13**(8):807-815.
106. Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I, Kelesidis T: **Community-acquired *Acinetobacter* infections.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007, **26**(12):857-868.
107. Lima AL, Oliveira PR, Paula AP: ***Acinetobacter* infection.** *N Engl J Med* 2008, **358**(26):2846; author reply 2846-2847.
108. Baran G, Erbay A, Bodur H, Onguru P, Akinci E, Balaban N, Cevik MA: **Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections.** *Int J Infect Dis* 2008, **12**(1):16-21.
109. Fournier PE, Richet H: **The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities.** *Clin Infect Dis* 2006, **42**(5):692-699.

110. Kennedy PJ, Haertsch PA, Maitz PK: **The Bali burn disaster: implications and lessons learned.** *J Burn Care Rehabil* 2005, **26**(2):125-131.
111. Maragakis LL, Perl TM: ***Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options.** *Clin Infect Dis* 2008, **46**(8):1254-1263.
112. Asensio A, Canton R, Vaque J, Calbo-Torrecillas F, Herruzo R, Arribas JL, Saenz MC: **[Prevalence of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain (1999-2005)].** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008, **26**(4):199-204.
113. Karageorgopoulos DE, Falagas ME: **Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections.** *Lancet Infect Dis* 2008, **8**(12):751-762.
114. Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II: **Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies.** *Crit Care* 2006, **10**(2):R48.
115. Abbo A, Carmeli Y, Navon-Venezia S, Siegman-Igra Y, Schwaber MJ: **Impact of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* on clinical outcomes.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007, **26**(11):793-800.
116. Wang SH, Sheng WH, Chang YY, Wang LH, Lin HC, Chen ML, Pan HJ, Ko WJ, Chang SC, Lin FY: **Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit.** *J Hosp Infect* 2003, **53**(2):97-102.
117. Levin AS, Gobara S, Mendes CM, Cursino MR, Sinto S: **Environmental contamination by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001, **22**(11):717-720.
118. Heritier C, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P: **A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the**

- carbapenem-hydrolysing oxacillinase **OXA-58**. *J Antimicrob Chemother* 2005, **55**(1):115-118.
119. Villers D, Espaze E, Coste-Burel M, Giauffret F, Ninin E, Nicolas F, Richet H: **Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology**. *Ann Intern Med* 1998, **129**(3):182-189.
120. Dijkshoorn L, van Aken E, Shunburne L, van der Reijden TJ, Bernardts AT, Nemec A, Towner KJ: **Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals**. *Clin Microbiol Infect* 2005, **11**(4):329-332.
121. Enoch DA, Summers C, Brown NM, Moore L, Gillham MI, Burnstein RM, Thaxter R, Enoch LM, Matta B, Sule O: **Investigation and management of an outbreak of multidrug-carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Cambridge, UK**. *J Hosp Infect* 2008, **70**(2):109-118.
122. Furtado GH, Martins ST, Machado AM, Wey SB, Medeiros EA: **Clinical culture surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in a teaching hospital in Sao Paulo, Brazil: a 7-year study**. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006, **27**(11):1270-1273.
123. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, Livermore D, Quinn JP: **Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals**. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(6):2001-2004.
124. van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P, Verhoef J, Brisse S: **Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals**. *Res Microbiol* 2004, **155**(2):105-112.
125. Longo B, Pantosti A, Luzzi I, Tarasi A, Di Sora F, Gallo S, Placanica P, Monaco M, Dionisi AM, Volpe I *et al*: **Molecular findings and antibiotic-**

- resistance in an outbreak of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *Ann Ist Super Sanita* 2007, **43**(1):83-88.
126. Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, Tripodi MF, Bagattini M, Cuccurullo S, Crivaro V, Ragone E, Mattei A, Galdieri N *et al*: **Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy.** *Clin Microbiol Infect* 2007, **13**(5):481-489.
127. Chuang YY, Huang YC, Lin CH, Su LH, Wu CT: **Epidemiological investigation after hospitalising a case with pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection.** *J Hosp Infect* 2009, **72**(1):30-35.
128. Go ES, Urban C, Burns J, Kreiswirth B, Eisner W, Mariano N, Mosinka-Snipas K, Rahal JJ: **Clinical and molecular epidemiology of acinetobacter infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam.** *Lancet* 1994, **344**(8933):1329-1332.
129. Morgan DJ, Weisenberg SA, Augenbraun MH, Calfee DP, Currie BP, Furuya EY, Holzman R, Montecalvo MC, Phillips M, Polsky B *et al*: **Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in New York City - 10 years into the epidemic.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009, **30**(2):196-197.
130. Jones RN, Deshpande L, Fritsche TR, Sader HS: **Determination of epidemic clonality among multidrug-resistant strains of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in the MYSTIC Programme (USA, 1999-2003).** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004, **49**(3):211-216.
131. Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, Quinn JP: **Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**(9):2941-2945.

132. Turton JF, Kaufmann ME, Warner M, Coelho J, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Pitt TL: **A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England.** *J Hosp Infect* 2004, **58**(3):170-179.
133. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H: **Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *J Antimicrob Chemother* 2010, **65**(2):233-238.
134. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D: **Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**(2):756-758.
135. Hanlon GW: **The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting.** *Lett Appl Microbiol* 2005, **41**(5):375-378.
136. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwartz D, Tarabeia J, Fefer I, Schwaber MJ, Carmeli Y: **Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**(5):1551-1555.
137. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H: **In vitro activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**(5):1586-1592.
138. Fernandez-Cuenca F, Egea P, Lopez-Cerero L, Diaz-De Alba P, Vila J, Pascual A: **[Comparison of 3 methods for determining sensitivity to imipenem and meropenem in *Acinetobacter baumannii* with a carbapenem-heteroresistant phenotype].** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008, **26**(8):485-488.

139. Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Maniatis AN, Tsakris A: **Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii***. *J Antimicrob Chemother* 2005, **55**(6):1055-1056.
140. Kwa AL, Loh C, Low JG, Kurup A, Tam VH: **Nebulized colistin in the treatment of pneumonia due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa***. *Clin Infect Dis* 2005, **41**(5):754-757.
141. Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J: **Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: a matched cohort study**. *Crit Care Med* 2003, **31**(10):2478-2482.
142. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jimenez-Jimenez FJ, Barrero-Almodovar AE, Garcia-Garmendia JL, Bernabeu-Wittel IM, Gallego-Lara SL, Madrazo-Osuna J: **Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP**. *Clin Infect Dis* 2003, **36**(9):1111-1118.
143. Owen RJ, Li J, Nation RL, Spelman D: **In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates**. *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**(3):473-477.
144. Peleg AY, Adams J, Paterson DL: **Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii***. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(6):2065-2069.
145. Curcio D, Fernandez F, Duret F: **Tigecycline use in critically ill older patients: case reports and critical analysis**. *J Am Geriatr Soc* 2007, **55**(2):312-313.
146. Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME: **Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-**

resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence.
J Antimicrob Chemother 2008, **62**(1):45-55.

147. Anthony KB, Fishman NO, Linkin DR, Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E: **Clinical and microbiological outcomes of serious infections with multidrug-resistant gram-negative organisms treated with tigecycline.**
Clin Infect Dis 2008, **46**(4):567-570.

8. TABELAS

Tabela 1. Descrição das Espécies de *Acinetobacter* spp.*

Nome da Espécie	Espécie Genômica
<i>A. calcoaceticus</i>	1
<i>A. baumannii</i>	2
<i>A. haemolyticus</i>	4
<i>A. junii</i>	5
<i>A. johnsonii</i>	7
<i>A. lwoffii</i>	8,9
<i>A. radioresistans</i>	12
<i>A. ursingii</i>	
<i>A. schindleri</i>	
<i>A. parvus</i>	
<i>A. bouvetii</i>	
<i>A. baylyi</i>	
<i>A. towneri</i>	
<i>A. tandoii</i>	
<i>A. grimontii</i>	
<i>A. tjernbergiae</i>	
<i>A. gernerii</i>	
<i>A. venetianus</i>	
	3
	6
	10
	11
	13BJ/14TU
	14BJ
	15BJ
	16
	17
	13TU
	15TU
	“Entre 1e 3”
	“Fortemente relacionada a 13TU”

* Adaptado de *Dijkshoorn L., et.al., 2007* [3].

Tabela 2. β - Lactamases identificadas em *A. baumannii**

Classificação de Bush-Jacoby-Medeiros	Classificação de Ambler	Enzima
1	C	AmpC
2b	A	TEM-1 e 2
2be	A	PER-1e 2 VEB-1, -1a e 3 TEM-92 e -116 SHV-5 e -12 GES-11 CTX-M-2
2c	A	RTG-2, CARB-2 e RTG-4
2d	D	Oxacilinasas
2e	B	IMP-1, -2, -4, -6, -8, -11 VIM-1, -4, -11 SIM-1
2f**	A	KPC-2, -3, -4, -10

*Adaptado de Zavascki A., et. al., 2010 [25].

**Robledo IE., et. al., 2009 [26].

Tabela 3. Subgrupos de OXA-carbapenemases identificadas em *A. baumannii**

Grupo	Subgrupo Filogenético	Componentes do Subgrupo	Localização	País de Origem
1	OXA-23	OXA-27, -49	Plasmidial e Cromossomal	Reino Unido, Singapura e China
2	OXA-24	OXA-25, -26, -40, - 72	Cromossomal	Espanha, Bélgica, França e Tailândia
3	OXA-51	OXA-64 a -71, -75 a -78, -84, -86 a -89, -91, - 92, - 94 e -95 e outras	Cromossomal	Argentina
4	OXA-58	OXA-96, -97**	Plasmidial e Cromossomal	França, Singapura, Tunísia
5	OXA-143	única	Plasmidial	Brasil***

* Adaptado de Poirel and Nordmann, 2006 [5].

** Zavascki et al., 2010 [25].

*** Higgins et al., 2009 [42].

9. FIGURAS

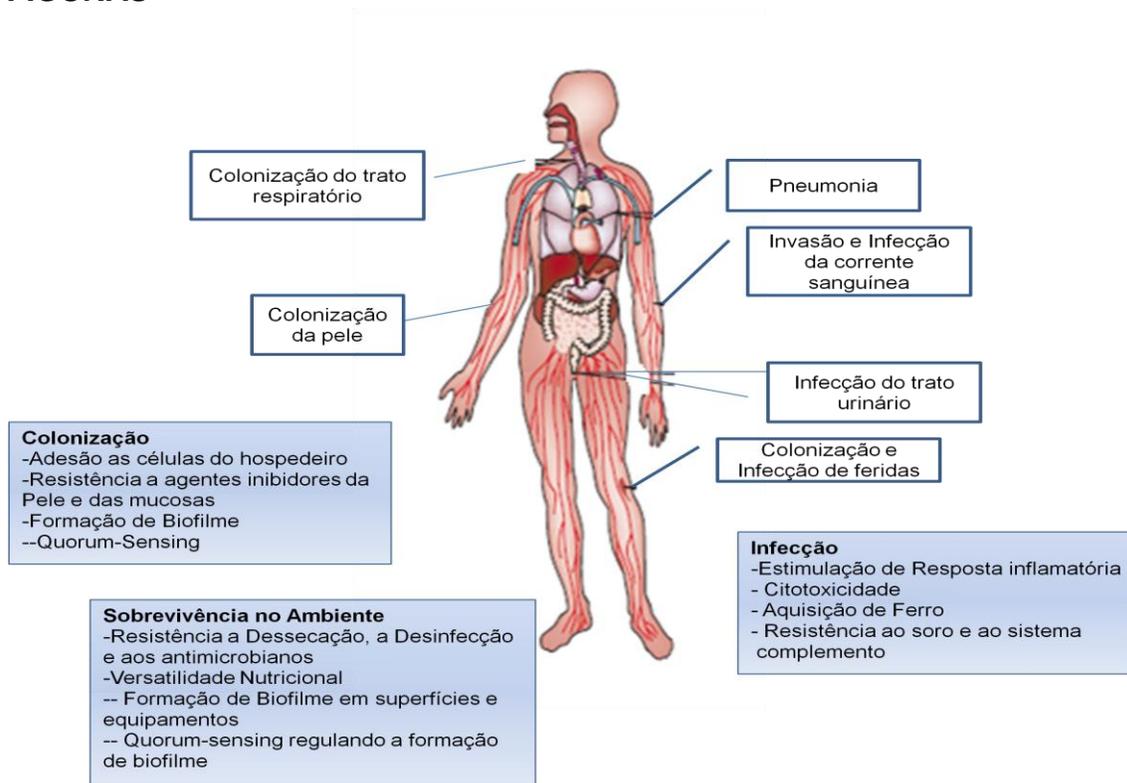


Figura 1. Fatores que contribuem para a permanência no ambiente, infecção e colonização de pacientes por *A. baumannii**

*Adaptado de Dijkshoorn L., et al., 2007 [3].

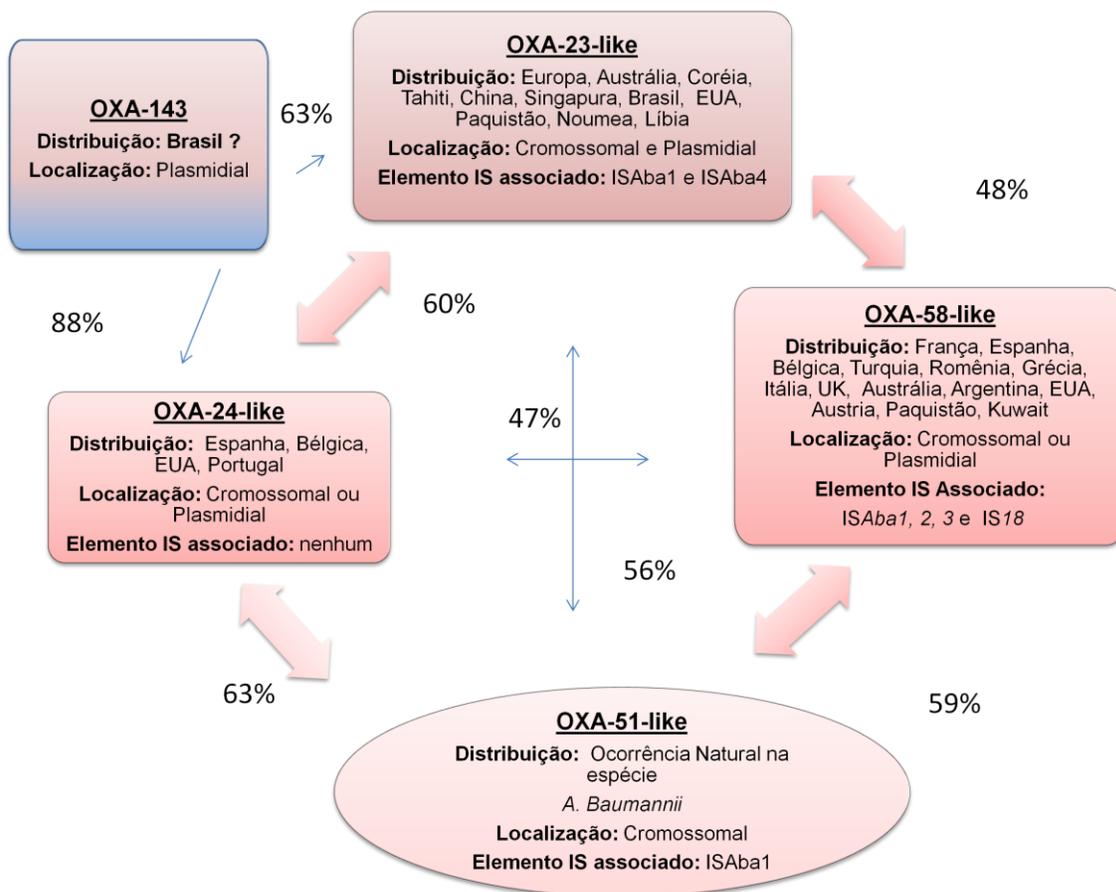


Figura 2. Resumo da distribuição e contexto genético enzimas do tipo OXA em *A. baumannii* *

As setas e as porcentagens correspondentes representam o grau de homologia de aminoácidos entre os diferentes grupos de enzimas. Os grupos dentro dos retângulos significam enzimas adquiridas em contraste com o grupo OXA-51-like dentro da elipse que é de ocorrência natural.

* Adaptado de Peleg et. al., 2008 [1].

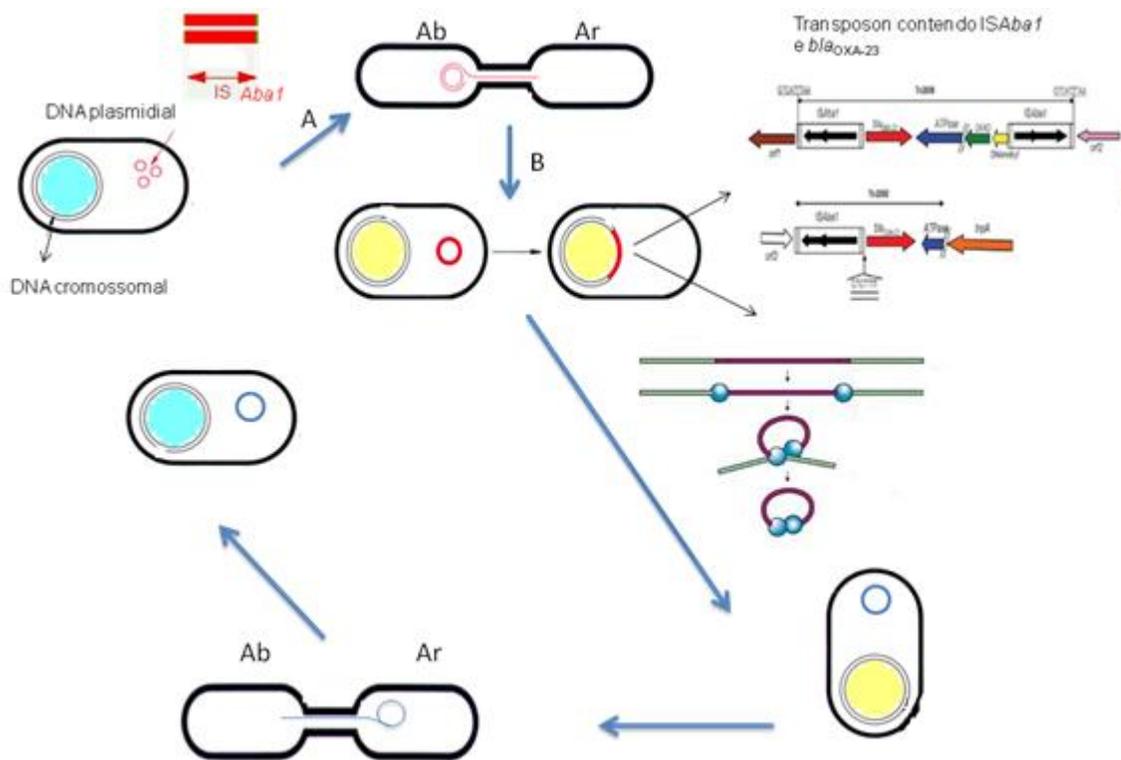


Figura 3. Representação esquemática da origem do gene *bla*_{OXA-23}.

Ab – *A. baumannii*; Ar- *A. radioresistens*. A- Transferência do elemento de inserção IS*Aba1* de Ab para Ar; B- Inserção de IS*Aba1* *upstream* e/ou *dowstream* ao gene *bla*_{OXA-23} formando a estrutura de transposon (Tn2008 ou Tn2006); C- Transposição do elemento móvel do cromossomo de Ar para um plasmídio; D- Transferência do plasmídio contendo o gene *bla*_{OXA-23} associado ao elemento promotor de Ar para Ab; E – Ab contendo o gene *bla*_{OXA-23} completo.

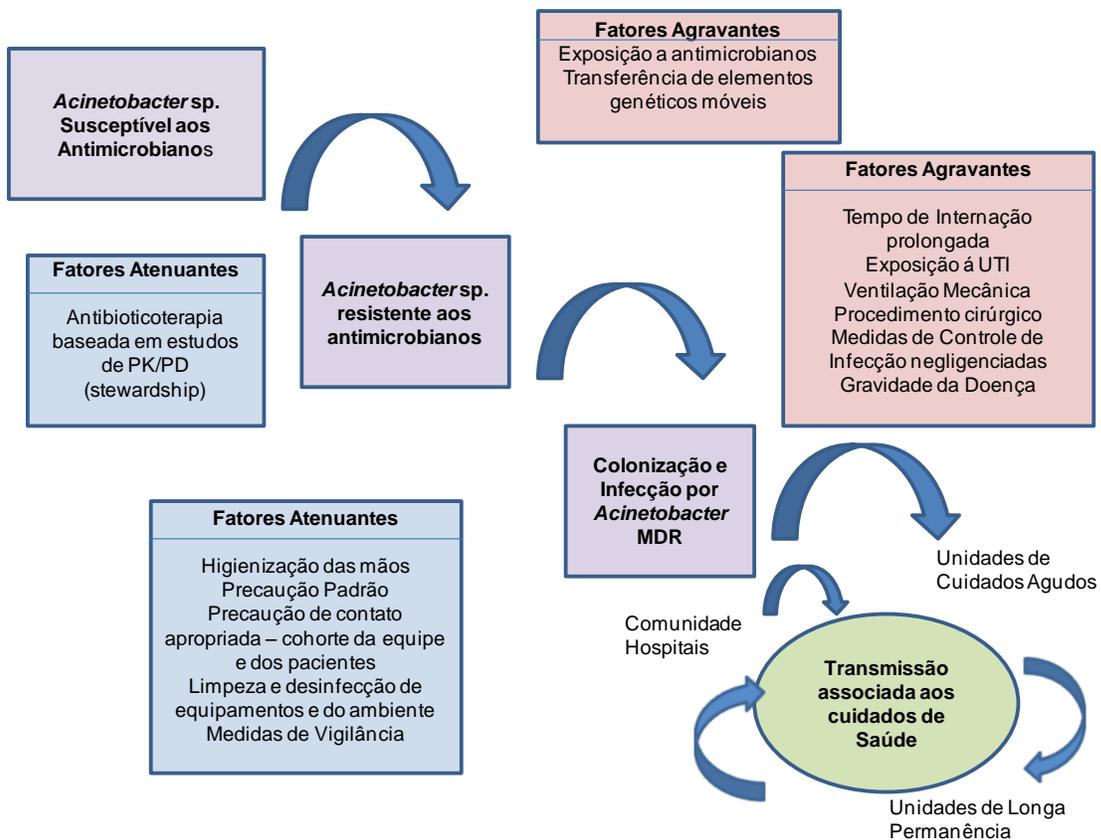


Figura 4. Fatores importantes na emergência e disseminação de *Acinetobacter* MDR*

* Adaptado de Maragakis LL., et al.,2008 [111].

10. ARTIGOS

10.1. Artigo 1 em Inglês: *Published: Infection 2009; 37: 474–476*

Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme: Dissemination in southern Brazil

A. F. Martins¹, R. Kuchenbecker², T. Sukiennik³, R. Boff⁴, K. C. Reiter¹, L. Lutz¹, A. B. M. P. Machado⁵, A. L. Barth^{1,5}

1. A. F. Martins, K. C. Reiter, L. Lutz, A. L. Barth (Medical Sciences Post-graduate Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil)

2. R. Kuchenbecker (Hospital Infection Control Committee, Hospital de Clínicas de Porto Alegre)

3. T. Suckiennik (Hospital Infection Control Committee, Complexo Hospitalar Santa Casa)

4. R. Boff (Centro Universitário IPA Metodista)

5. A.B.P. Machado, A. L. Barth (Microbiology and Molecular Biology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre)

Corresponding author: Andreza Francisco Martins - Mail address: Coordenadoria de Vigilância em Saúde de Porto Alegre. 372/3 Padre Cacique Avenue. Zip code: 90000-000. Porto Alegre – RS. Brazil. Fax number: 55(51) 21018607. Email: andreza_20@pop.com.br or andrezafm@sms.prefpoa.com.br

Acinetobacter baumannii has emerged as important nosocomial pathogen due to its ability of long-term survival in the hospital environment, which facilitate spreading, causing institutional outbreaks, and due to acquired multiple mechanisms of antimicrobial resistance [1]. A number of factors such as immunosuppression, use of invasive devices and use of antimicrobial agents have been reported as increasing the risk of infection or colonization by this opportunistic pathogen [2].

The carbapenems used to be an effective therapeutic option for treatment of *Acinetobacter* sp. infections. However, in the last few years; carbapenem-resistant *Acinetobacter* species were recovered worldwide. Loss of porins, alterations in the penicillin-binding protein (PBP) affinity, and different class B (metalloenzymes) and D (OXA enzymes) b-lactamases have been associated with resistance to carbapenems in *A. baumannii* [3].

The OXA carbapenemases of *Acinetobacter* are divided into four phylogenetic subgroups: OXA-23, OXA-24 and OXA-58 (acquired enzymes) and OXA-51 that is intrinsic to *A. baumannii* [4]. In Brazil, the first report of acquired oxacillinase has been described in Curitiba [5] in 2003 but the carbapenem resistance seems to constitute an emerging problem in other regions of the country and Latin America [6].

In Porto Alegre, a city with 1,4 million inhabitants and 7700 of beds situated in 25 hospitals, the first isolate of carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) was identified only in 2004 but further CRAB has been reported to the local Health

Department in an unprecedented outbreak involving 16 hospitals and more than 500 detected cases from 2004 to 2008 [7].

The goal of this study was to investigate the mechanisms of emerging resistance to carbapenems in multiresistant *A. baumannii* isolates and to characterize the molecular type using pulsed-field gel electrophoresis.

A total of 53 CRAB isolates were obtained from patients attending two university tertiary teaching hospitals in Porto Alegre from July to December, 2007 (1 isolate per patient). Three isolates were obtained from the environment in hospital 2 through surveillance culture during an outbreak investigation. Isolates were identified using the API 20NE system (Biomerieux, Basingstoke, United Kingdom).

Antimicrobial susceptibility test was performed by the disk-diffusion method, as described by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) [8]. The MICs of imipenem and meropenem were established using the E-test.

The presence of genes coding for blaOXA-23-like, blaOXA-24-like, blaOXA-58-like and blaOXA-51-like were detected by multiplex PCR as described previously with minor modifications [9]. Positive controls included *Acinetobacter* spp. strains known to produce OXA-23-like, OXA-24-like and OXA-58-like enzymes [5], and the type strain of *A. baumannii* ATCC 19606 (negative control) for these genes and positive for OXA-51-like (intrinsic to *A. baumannii*).

All three isolates from the hospital environment as well as a set of 13 clinical isolates of CRAB, randomly selected from all clinical isolates, which were stored at -80°C, were selected for molecular typing. Macrorestriction analysis of chromosomal DNA with SmaI (Invitrogen, Paisley, United Kingdom) was carried out by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) using a CHEF-DRII apparatus. The band patterns were interpreted according to the recommendations of Tenover et al [10].

The 53 clinical isolates were recovered from the lower respiratory tract (n=39), blood (n=9), urine (n=2) and other clinical specimens (n=3). These isolates were obtained from adult patients in intensive care units (ICU; n=42) and from a clinical ward (n=11). Three CRAB isolates from the environment were obtained from a mobile RX machine, from a shelf at the infirmary and from the surface of a table surrounding the bed from a colonized.

All clinical and environmental isolates proved to be resistant to carbapenems by the disk-diffusion method as well by E-test (MIC > 16 µg/mL). All clinical isolates of CRAB were also resistant to ciprofloxacin, gentamycin, piperacillin/tazobactan and trimethoprim/sulphamethoxazole. Only a minority of CRAB was susceptible to ampicillin/sulbactam and ceftazidime (data not shown).

All CRAB isolates were positive for *bla*_{OXA-23-like} gene but none presented *bla*_{OXA-58-like} or *bla*_{OXA-24-like} genes. The presence of the gene *bla*_{oxa-51-like} in all isolates confirmed to be *A. baumannii* [9].

A total of 16 CRAB isolates were randomly selected for molecular typing (Table 1). Five distinct PFGE profiles were identified among the 16 CRAB isolates from both hospitals. Two major types were identified: type “A” (5 isolates) and type “B” (7 isolates). Type “A” was found only in hospital 1 in contrast to type “B” which was found in both hospitals (one isolate in hospital 1 and 6 isolates in hospital 2). All three CRAB obtained from the environment from hospital 2 proved to belong to major type “B”. There was no correlation between the susceptibility profile and the PFGE type of CRAB isolates.

The emergence of resistance to carbapenems in *A. baumannii* has limited the therapeutic options to treat infections caused by these bacteria. In fact, CRAB tend to be multi-resistant [11] and in this study the multi-resistance was confirmed as only a minority of CRAB were susceptible to other antibiotics. It has been, therefore, suggested that colistin may be the only antibiotic effective against CRAB [11]. We did not evaluate the polymyxins in the present study.

Although penicillin-binding protein modification and/or porin loss have been reported as mechanisms of resistance in *Acinetobacter* spp, it is the carbapenemase production the most worrying mechanism of β -lactamase resistance in the genus [12]. In fact, the combination of β -lactamase production and porin loss is the most synergic resistance mechanism to carbapenems.

The OXA-23 enzyme has originally been reported in *Acinetobacter* from Scotland in 1985 and termed ARI-1 [13]. OXA-23 was further reported in patients from England, South America and Asia [13]. In the present report, we were able to

identify the *A. baumannii* producing OXA-23 enzyme in all clinical isolates and this is the first report the OXA-23 in the city of Porto Alegre.

We were able to type 16 CRAB isolates by PFGE and we found that there were two main types and a few minor types disseminated in both hospitals. Noteworthy, CRAB clinical isolates from the same type were found in both hospitals and CRAB from the environment also belonged to this major type. This indicates that the OXA-23 CRAB dissemination may occur in both ways: by transmission of the same strain among different patients and from the environment as well as by horizontal transmission of the genetic element carrying this gene. In fact, the polyclonal dissemination of CRAB has been described in other studies around the world [14,15].

In conclusion, our work indicates that OXA-23 enzyme is probably the major factor for carbapenem resistance in *A. baumannii* in the two teaching hospitals from Porto Alegre although other resistance mechanisms may be involved. Moreover, the CRAB dissemination may be complex as it may be related to both patient-to-patient transmission and/or the spreading of the genetic element containing the gene.

Acknowledgments

This study has received financial support from “Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre”. We thank Dr Libera Dalla-Costa who kindly provided *Acinetobacter* sp which were used as positive controls in this study.

References

1. Karageorgopoulos DE and Falagas ME: Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:751-62.
2. Wareham DW, Bean DC, Khanna P, et al.: Bloodstream infection due to *Acinetobacter* spp: epidemiology, risk factors and impact of multi-drug resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(7): 607-612.
3. Poirel L and Nordmann P: Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (9): 826-836.
4. Chao Qi, Malczynski M, Parker M, Scheetz MH: Characterization of Genetic Diversity of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains Collected from 2004 to 2007. *J Clin Microbiol* 2008; 46(3): 1106-1109.
5. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HAPHM, et al: Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7): 3403-3406.

6. Gales AC, Pfaller MA, Sader HS, Hollis RJ, Jones RN: Genotypic Characterization of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter* spp. isolated in Latin America. [Microb Drug Resist.](#) 2004; 10(4):286-91.
7. Breier A and Martins AF: Surto de Multirresistência em Porto Alegre – Vigilância Epidemiológica de Casos. In: XVIII IEA World Congress of Epidemiology. Porto Alegre, Brazil, 2008.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute 2007: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Approved standard M100–S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
9. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM et al.: Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agent* 2006; 27: 351–353.
10. Tenover F, Arbeit R, Goering R: How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 426–439.
11. Baran G, Erbay A, Bodur H et al.: Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections *Int J Infect Dis* 2008; 12:16-21.
12. Bou G, Cervero G, Domingues MA, Quereda C, Martinez-Beltran J: Characterization of a Nosocomial Outbreak Caused by a Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Strain with a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme: High-

Level Carbapenem Resistance in *A. baumannii* Is Not Due Solely to the Presence of b-Lactamases. J Clin Microbiol 2000; 38(9): 3299-3305.

13. Walther-Rasmussen J and Hoiby N: OXA-type carbapenemases. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 373–383.

14. Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME et al.: Occurrence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clones at Multiple Hospitals in London and Southeast England. J Clin Microbiol 2006; 44(10): 3623-3627.

15. Villegas MV, Kattan JN, Correa A et al.: Dissemination of *Acinetobacter baumannii* Clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian Hospitals. Antimicrob Agent Chemother. 2007; 51(6): 2001-2004.

Table 1. Molecular typing of *A. baumannii* OXA-23 isolates

Hospital	Isolate number	Susceptibility Profiles*								PFGE Group
		AMPS	CAZ	CIP	GEN	IMI	MER	PIP	SUT	
1	9	I	R	R	R	R	R	R	R	A1
1	10	S	R	R	R	R	R	R	R	A
1	12	R	R	R	R	R	R	R	R	B1
1	20	R	R	R	R	R	R	R	R	A
1	28	R	R	R	R	R	R	R	R	A
1	31	R	R	R	R	R	R	R	R	C
1	41	S	R	R	R	R	R	R	R	A
2	70	S	S	R	R	R	R	R	R	B
2	56**	R	I	R	R	R	R	R	R	B1
2	71**	R	I	R	R	R	R	R	R	B
2	72**	R	I	R	R	R	R	R	R	B
2	105	S	I	R	R	R	R	R	R	B
2	120	R	S	R	R	R	R	R	R	B
2	122	S	R	R	R	R	R	R	R	D
2	127	S	R	R	R	R	R	R	R	E
2	129	R	R	R	R	R	R	R	R	E

*AMPS - ampicilin/sulbactam, CAZ – ceftazidime, CIP – ciprofloxacin, GEN – gentamicin, IMI – Imipenem, MER – Meropenem, PIP – piperacillin-tazobactam, SUT – trimethoprim-sulfamethoxazole ; ** environmental isolates

10.2. Artigo 1 em Português : Publicado: *Infection* 2009; 37: 474–476

***Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos produtor da enzima
OXA-23: Disseminação no sul do Brasil**

A. F. Martins¹, R. Kuchenbecker², T. Sukiennik³, R. Boff⁴, K. C. Reiter¹, L. Lutz¹, A. B. M. P. Machado⁵, A. L. Barth^{1,5}

1. A. F. Martins, K. C. Reiter, L. Lutz, A. L. Barth (Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil)

2. R. Kuchenbecker (Serviço de Controle de Infecção, Hospital de Clínicas de Porto Alegre)

3. T. Suckiennik (Serviço de Controle de Infecção, Complexo Hospitalar Santa Casa)

4. R. Boff (Centro Universitário IPA Metodista)

5. A.B.P. Machado, A. L. Barth (Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre)

Autor Correspondente: Andreza Francisco Martins - Endereço: Coordenadoria de Vigilância em Saúde de Porto Alegre. Av. Padre Cacique 372/3. Cep: 90000-000. Porto Alegre – RS. Brasil. Fax: 55(51) 21018607. Email: andreza_20@pop.com.br or andrezafm@sms.prefpoa.com.br

Acinetobacter baumannii tem emergido como um importante patógeno nosocomial, devido a sua habilidade de sobreviver por longos períodos no ambiente hospitalar, fato que facilita a disseminação levando a surtos nas instituições e devido a aquisição de múltiplos mecanismos de resistência antimicrobiana [1]. Alguns fatores tais como imunossupressão, procedimentos invasivos e o uso de antimicrobianos tem sido relatado como fatores de risco que aumentam as chances de infecção ou colonização por este patógeno oportunista [2].

Os carbapenêmicos são utilizados como uma efetiva opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* sp. Entretanto, nos últimos anos, espécies de *Acinetobacter* resistentes aos carbapenêmicos foram isoladas por todo o mundo. Perda de porinas, alterações na afinidade das proteínas ligantes de penicilinas (PBP) e diferentes b-lactamases da classe B (metaloenzimas) e da classe D (enzimas do tipo OXA) tem sido associados com a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* [3].

As OXA carbapenemases identificadas em *Acinetobacter* são divididas em quatro grupos filogenéticos: OXA-23, OXA-24 and OXA-58 (enzimas adquiridas) e OXA-51 que é intrínseca a *A. baumannii* [4]. No Brasil, o primeiro relato de oxacilinase adquirida foi descrito em Curitiba em 2003 [5] mas a resistência aos carbapenêmicos tem sido vista como um problema emergente em outras regiões do país e da América Latina [6].

Em Porto Alegre, uma cidade com 1,4 milhões de habitantes e 7700 leitos situados em 25 hospitais, o primeiro caso de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB) foi identificado somente em 2004 mas posteriormente, casos de infecção/colonização por CRAB foram relatados ao Departamento de Saúde Local em um surto sem precedentes envolvendo 16 hospitais e mais de 500 casos de 2004 a 2008 [7].

O objetivo deste estudo foi investigar os mecanismos envolvidos na emergência da resistência aos carbapenêmicos em isolados de *A. baumannii* multiresistentes e caracterizar o perfil molecular usando pulsed-field gel electrophoresis.

Um total de 53 isolados de CRAB foram obtidos de pacientes atendidos em dois hospitais terciários, técnicos e universitários de Porto Alegre, de Julho a Dezembro de 2007 (1 isolado por paciente). Três isolados foram obtidos do ambiente do hospital 2, através de culturas de vigilância durante a investigação de um surto. Isolados foram identificados pelo sistema API 20NE (Biomérieux, Basingstoke, United Kingdom). Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos foi realizado pelo método de disco-difusão, de acordo com as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) [8]. A CIM do imipenem e do meropenem foi determinada por E-test.

A presença dos genes codificando para blaOXA-23-like, blaOXA-24-like, blaOXA-58-like and blaOXA-51-like foi detectada pelo método de Multiplex PCR como previamente descrito, com poucas modificações [9]. Controles positivos

incluindo cepas de *Acinetobacter* spp produtoras de OXA-23-like, OXA-24-like and OXA-58-like [5] e a cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 foi usada como controle negativo para esses genes e positivo para OXA-51-like (intrínseco de *A. baumannii*).

Todos os isolados coletados do ambiente hospitalar bem como um conjunto de 13 isolados clínicos de CRAB, aleatoriamente selecionados de todos os isolados clínicos que foram estocados a -80°C, foram selecionados para tipagem molecular. Macrorestrição do DNA com *Sma*I (Invitrogen, Paisley, United Kingdom) foi seguida por pulsed field gel electrophoresis (PFGE) usando o equipamento CHEF-DRII. O padrão das bandas foi interpretado de acordo com os critérios de Tenover et al [10].

Os 53 isolados clínicos foram recuperados do trato respiratório inferior (n=39), sangue (n=9), urina (n=2) e de outros materiais (n=3). Estes isolados foram obtidos de pacientes adultos nas unidades de terapia intensiva (UTI; n=42) e de unidades clínicas (n=11). Três isolados de CRAB do ambiente foram obtidos do equipamento de RX, de uma prateleira e da superfície de uma mesa localizada ao redor do leito de um paciente colonizado por CRAB.

Todos os isolados clínicos e do ambiente foram resistentes aos carbapenêmicos tanto por disco-difusão quanto por E-test (CIM > 16 µg/mL). Todos os isolados clínicos foram também resistentes a ciprofloxacina, gentamicina, piperacilina/tazobactam e sulfametoxazol/trimetoprim. Apenas alguns

poucos isolados de CRAB foram suscetíveis a ampicilina/sulbactam e ceftazidima (dados não mostrados).

Todos os isolados de CRAB foram positivos para o gene *bla*_{OXA-23-like} mas nenhum apresentou os genes *bla*_{OXA-58-like} ou *bla*_{OXA-24-like}. A presença do gene *bla*_{OXA-51-like} em todos os isolados confirmou que os mesmos são *A. baumannii* [9].

Um total de 16 isolados de CRAB foram aleatoriamente selecionados para tipagem molecular (tabela 1). Cinco diferentes perfis de PFGE foram identificados entre os 16 isolados.

Dois tipos majoritários foram identificados: tipo A (5 isolados) e tipo B (7 isolados). O tipo A foi encontrado somente no Hospital 1 ao contrário do tipo B que foi encontrado em ambos hospitais (1 isolado no hospital 1 e 6 isolados no hospital 2). Todos os isolados de CRAB obtidos do ambiente foram do hospital 2 e pertencem ao tipo B. Não houve correlação entre o perfil de suscetibilidade e o perfil de PFGE dos isolados de CRAB.

A emergência da resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* tem limitado as opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por esta bactéria. Na realidade, isolados CRAB tendem a ser multiresistentes [11 e neste estudo este fato foi confirmado, já que somente poucos isolados foram suscetíveis a outros antimicrobianos. Nesta situação, provavelmente apenas a

colistina possa ser efetiva contra CRAB [11]. No presente estudo, as polimixinas não foram avaliadas.

Embora modificação nas proteínas ligantes de penicilinas e/ou perda de porinas tenham sido relatados como mecanismos de resistência em *Acinetobacter* spp., a produção de carbapenemases é o mais preocupante mecanismo de resistência aos β -lactâmicos neste gênero [12]. Cabe ressaltar que a combinação de β -lactamases e a perda de porinas é o mecanismo de resistência mais efetivo para os carbapenêmicos.

A enzima OXA-23 foi originalmente relatada em *Acinetobacter* no ano de 1985 na Escócia e foi denominada de ARI-1 naquela ocasião [13]. No presente relato, nós identificamos a produção da enzima OXA-23 em todos os isolados clínicos de *A. baumannii* testados e este é o primeiro relato de OXA-23 na cidade de Porto Alegre.

Nós realizamos a tipagem molecular de 16 isolados de CRAB por PFGE e encontramos dois tipos principais e um tipo minoritário disseminado em ambos os hospitais.

Notoriamente, isolados clínicos de CRAB do mesmo tipo foram encontrados em ambos os hospitais e isolados obtidos do ambiente também pertenceram a este tipo majoritário. Isto indica que a disseminação de CRAB OXA-23 pode ocorrer de ambas as formas: por transmissão de uma mesma cepa entre diferentes pacientes e a partir do ambiente bem como pela transmissão horizontal de elementos

genéticos móveis contendo este gene. É fato que a disseminação policlonal de CRAB tem sido descrita em outros estudos ao redor do mundo [14,15].

Concluindo, nosso trabalho indique que a enzima OXA-23 é provavelmente o fator principal da resistência aos carbapenêmicos nos dois hospitais de Porto Alegre embora outros mecanismos possam estar envolvidos. A disseminação de CRAB é complexa e pode envolver tanto a transmissão de paciente a paciente e/ou a transferência de elementos genéticos móveis contendo o gene de resistência.

Agradecimentos

Este estudo recebeu aporte financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Nós agradecemos a Dra. Libera Dalla-Costa que nos cedeu os controles positivos de *Acinetobacter* sp. que foram usados neste estudo.

Referências

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

2. Wareham DW, Bean DC, Khanna P, et al.: Bloodstream infection due to *Acinetobacter* spp: epidemiology, risk factors and impact of multi-drug resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27(7): 607-612.
3. Poirel L and Nordmann P: Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006; 12 (9): 826-836.
4. Chao Qi, Malczynski M, Parker M, Scheetz MH: Characterization of Genetic Diversity of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains Collected from 2004 to 2007. J Clin Microbiol 2008; 46(3): 1106-1109.
5. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HAPHM, et al: Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. J Clin Microbiol 2003; 41(7): 3403-3406.
6. Gales AC, Pfaller MA, Sader HS, Hollis RJ, Jones RN: Genotypic Characterization of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter* spp. isolated in Latin America. [Microb Drug Resist.](#) 2004; 10(4):286-91.
7. Breier A and Martins AF: Surto de Multirresistência em Porto Alegre – Vigilância Epidemiológica de Casos. In: XVIII IEA World Congress of Epidemiology. Porto Alegre, Brasil, 2008.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute 2007: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Approved standard M100–S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

9. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM et al.: Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agent* 2006; 27: 351–353.
10. Tenover F, Arbeit R, Goering R: How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 426–439.
11. Baran G, Erbay A, Bodur H et al.: Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections *Int J Infect Dis* 2008; 12:16-21.
12. Bou G, Cervero G, Domingues MA, Quereda C, Martinez-Beltran J: Characterization of a Nosocomial Outbreak Caused by a Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Strain with a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme: High-Level Carbapenem Resistance in *A. baumannii* Is Not Due Solely to the Presence of b-Lactamases. *J Clin Microbiol* 2000; 38(9): 3299-3305.
13. Walther-Rasmussen J and Hoiby N: OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 373–383.
14. Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME et al.: Occurrence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clones at Multiple Hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol* 2006; 44(10): 3623-3627.
15. Villegas MV, Kattan JN, Correa A et al.: Dissemination of *Acinetobacter baumannii* Clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian Hospitals. *Antimicrob Agent Chemother.* 2007; 51(6): 2001-2004.

Tabela 1. Tipagem Molecular de isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23

Hospital	Nº Isolado	Perfil de Susceptibilidade*								Grupo PFGE
		AMPS	CAZ	CIP	GEN	IMI	MER	PIP	SUT	
1	9	I	R	R	R	R	R	R	R	A1
1	10	S	R	R	R	R	R	R	R	A
1	12	R	R	R	R	R	R	R	R	B1
1	20	R	R	R	R	R	R	R	R	A
1	28	R	R	R	R	R	R	R	R	A
1	31	R	R	R	R	R	R	R	R	C
1	41	S	R	R	R	R	R	R	R	A
2	70	S	S	R	R	R	R	R	R	B
2	56**	R	I	R	R	R	R	R	R	B1
2	71**	R	I	R	R	R	R	R	R	B
2	72**	R	I	R	R	R	R	R	R	B
2	105	S	I	R	R	R	R	R	R	B
2	120	R	S	R	R	R	R	R	R	B
2	122	S	R	R	R	R	R	R	R	D
2	127	S	R	R	R	R	R	R	R	E
2	129	R	R	R	R	R	R	R	R	E

*AMPS - ampicilina/sulbactam, CAZ – ceftazidima, CIP – ciprofloxacina, GEN – gentamicina, IMI – Imipenem, MER – Meropenem, PIP – piperacillina/tazobactam, SUT – sulfametoxazol/trimetoprim ; ** isolados do ambiente

10.3. Artigo 2 em Inglês

To be submitted to European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease

Co-circulation of different clones of *Acinetobacter baumannii* producing *bla*_{OXA-23} gene in hospitals from southern Brazil

A. F. Martins¹, L. Massi², K. O. Pilger³, M. Pagano⁴, F. Paris^{1,3}, L. Pretto², A. B. M. P. Machado³, A. L. Barth^{1,3}

1. A. F. Martins, A. L. Barth (Medical Sciences Post-graduate Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil)
2. L. Massi, L. Pretto (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil)
3. F. Paris, A.B.P. Machado, A. L. Barth (Microbiology and Molecular Biology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre)
4. M. Pagano (Centro Universitário IPA Metodista)

Corresponding author: Andreza Francisco Martins - Mail address: Coordenadoria de Vigilância em Saúde de Porto Alegre. 372/3 Padre Cacique Avenue. Zip code: 90000-000. Porto Alegre – RS. Brazil. Fax number: 55(51) 32892434. Email: andreza_20@pop.com.br or andrezafm@sms.prefpoa.com.br

Keywords: *A. baumannii*, Molecular Epidemiology, *bla*_{OXA-23}

ABSTRACT

Background: *Acinetobacter baumannii* has frequently been associated to outbreaks in ICU in the last decade. The ability to acquire resistance to antibiotics in particular to carbapenems, as well as to be spread among patients, is related the capacity to cause outbreaks. The aim of this study was to evaluate the spread of *A. baumannii* carbapenem-resistant in the city of Porto Alegre by means of molecular typing.

Methods: *A. baumannii* isolates (n=240) from ICU of five hospitals were recovered from July 2007 to June 2008. PCR was used to identify the presence of genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}. The REP-PCR and PFGE were performed for molecular typing.

Results: The isolates were collected mostly from men over 50 years which underwent mechanical ventilation. Twenty-two clonal groups were obtained by REP-PCR and fourteen clonal groups were obtained by PFGE using cut-off of 85% to establish the similarity level. Eight major clonal groups were obtained by molecular typing and three of them were found in all hospitals.

Conclusion: The presence of 3 major clones in all hospitals demonstrates the spread of *A. baumannii* inter-institucional. The REP-PCR method is a good and fast alternative technique for typing. The monitoring of epidemic strains by molecular methods is more important to preventing or to reducing spread these.

Keywords: REP-PCR, PFGE, carbapenem-resistant, *A. baumannii*

INTRODUCTION

Opportunistic microorganisms such as *Acinetobacter* sp. has emerged in recent years as important nosocomial pathogens mainly due to multidrug-resistance. *Acinetobacter baumannii* also has special characteristics such as resistance to desiccation, the ability to survive for long periods on dry surfaces and propensity to acquire resistance determinants to a wide range of antibacterial agents [1, 2].

Carbapenems were the therapy of choice to treat serious infections caused by *Acinetobacter baumannii* [3]. However, outbreaks related to *A. baumannii* producing of carbapenemases, especially oxacillinases, have been widely reported [1, 4]. Patients who underwent invasive procedures, immunocompromised and admitted to ICU are the most affected [5]. Common infections include mainly ventilator-associated pneumonia and bacteremia [3].

Different countries have reported the occurrence of distinct strains of *Acinetobacter baumannii* carbapenem-resistant related to hospital outbreaks, which can be sporadic, epidemic or endemic [6-10]. Epidemic strains had been reported in different hospitals co-circulating with sporadic strains [11, 12]. The capacity of any strain to become epidemic and cause outbreaks is related to its virulence factors and to resistance to multiple antibiotics [2]. Most of these outbreaks have been attributed to expression of oxacillinases and among them the gene *bla*_{OXA-23} is the most widespread worldwide [1, 8, 13]. In last decade, some

studies also have reported the spread of the gene *bla*_{OXA-23} among hospitals in different cities in Brazil [7, 14, 15].

Molecular typing methods have been used to establish the genetic relatedness among isolates from different sources. The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of DNA fragments has high discriminatory power however, it is labor intensive and costly [1, 16, 17]. Thus, typing methods based on PCR, such as REP-PCR, have become an alternative for PFGE for *A. baumannii* typing [17, 18]. Therefore, the objective of this study is evaluated by PFGE and REP-PCR the dissemination of CRAB among different hospitals in our city.

MATERIALS AND METHODS

Setting

This study was performed in Porto Alegre (PA) city, southern Brazil from July/2007 to July/2008. PA is a city with 1.4 million inhabitants and 7,223 hospital beds of which 1,017 are ICU beds [19]. In the period of study, the local Department of Health Surveillance was informed that occurred 408 cases of infection from 393 patients in ICU of different hospitals. We were able to evaluate 240 isolates of *Acinetobacter* sp. carbapenem-resistant from ICUs of 5 hospitals which represent 61% of the total number of CRAB cases.

Isolates and Susceptibility tests

Acinetobacter sp. isolates were obtained from different clinical specimens collected only from patients admitted to ICUs. Only one isolated per patient was included. Identification of the organisms was initially performed by either API 20NE (BioMerieux Basingstoke, United Kingdom) or Vitek 2 (BioMerieux Basingstoke, United Kingdom) . Antimicrobial susceptibility test was performed by the disk-diffusion method, as described by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) [20]. Isolates were considered multidrug-resistant (MDR) whether resistant to more than 3 classes of antibiotics and were considered pan-resistant (PAN-R) whether resistant to all classes of antibiotics tested, except colistin [21]. The MIC of imipenem was established using MICE[®](Oxoid). PCR for the *bla*_{OXA-51} gene was performed in order to identify *A. baumannii*. Isolates were collected and stored at -80°C in glycerol broth.

PCR for Oxacillinases

The presence of genes coding for *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} and *bla*_{OXA-51-like} were detected by multiplex PCR as described previously with minor modifications [22]. Positive controls included *Acinetobacter* sp. strains known to produce OXA-23, OXA-24 and OXA-58 enzymes that were previously sequenced, and the type strain of *A. baumannii* ATCC 19606 (negative control for OXA-23, OXA-24 and OXA-58) positive control for OXA-51-like (intrinsic to *A. baumannii*).

Molecular Typing

Isolated positive for OXA-23-like and OXA-51-like were selected to be genotyped by REP-PCR using REP-1 and REP-2 primers. REP-PCR was performed as described previously [16]. The following amplification protocol was used: initial denaturation at 94°C for 10min, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1min, annealing at 43°C for 1min, extension at 72°C for 1min and a final extension at 72°C for 16 min. REP-PCR products were separated by agarose gel (2%) electrophoresis in 0,5X TBE.

At least one isolate of each REP-PCR clonal group was analyzed by PFGE using a CHEF-DRII apparatus with the restriction endonuclease *Apal* [16]. Analysis of PFGE patterns was performed by BioNumerics version 6.0 of photographs of ethidium bromide-stained gels.

Isolates were considered to be part of a major cluster (clonal group) whenever they had similarity higher than 85% after the dendrogram had been constructed using the band-based Dice coefficient method [23]. A similarity matrix was clustered using the unweighted pair group method of arithmetic averages (UPGMA).

RESULTS

In the period of this study, we evaluated 240 isolates of *Acinetobacter* sp. of ICU patients from five hospitals of Porto Alegre: 41 (17.1%) from hospital 1, 118 (49.16%) from hospital 2, 24 (10.0%) from hospital 3, 32 (13.33%) from hospital 4 and 25 (10.41%) from hospital 5. The majority of isolates (162 - 67.5%) was

obtained from the low respiratory tract, followed by blood (23 isolates - 9.58%), urine (20 - 8.33%), wound (2 - 0.84%) and others (33-13.75%). One hundred and six (60.8%) isolates were obtained from males and the average age was 55.46 ± 19.15 years (mean \pm SD). Length of stay after CRAB diagnosis was 21.3 ± 17.5 days (mean \pm SD) and 62 (26%) of patients had been hospitalized in the last 90 days (table 1). It is of note that, 200 (83.5%) of patients underwent mechanical ventilation and 228 (95.2%) received prior the diagnosis of infection by *Acinetobacter* sp. Carbapenems were the most prescribed antibiotics (table 1) followed by 3rd generation cephalosporins and quinolones. Of the 240 isolates, 139 (58%) were considered MDR and 101 (42%) were PAN-R. The majority of PAN-R isolates (69 isolates -68.3%) were obtained from hospital 2.

We were able to identify the *bla*_{OXA-23-like} gene in 238 (99.0%) of isolates and *bla*_{OXA-51-like} gene in 239 (99.6%). A total of 211 isolates (all positive for OXA-23 and OXA-51) were submitted to molecular typing by REP-PCR and it was possible to identify 22 clonal groups. According to REP-PCR the majority of CRAB isolates 175 (83%) were included in 8 clonal groups (table 2) each containing at least 10 isolates. On the other hand, eight clonal groups contained only one isolate.

Three REP-PCR clonal groups (clones 3, 4 and 11) were identified in all hospitals (table 2). The distribution of these clones over time in each hospital indicated that the clone 4 was more prevalent in March 2008 (figure 1). In fact, clones 3 and 4 were more prevalent in the summer period (January, February and March 2008) while clone 11 presented a more regular distribution towards an

increase in May 2008 (fig. 1A). The increased numbers of isolates belonging to clone 11 in May 2008 was related to an outbreak in hospital 5 (fig. 1F). The number of isolates belonging to clones 3 and 4 tended to fluctuate over the study period in different hospitals (fig.1B-E)

Forty one isolates representing each of the 22 REP-PCR clones were further typed by PFGE (figure 2) and fourteen clonal groups were obtained. All isolates of the eight major clonal groups by REP-PCR were similarity grouped by PFGE and all were positive to *bla*_{OXA-23} gene. Two isolates which were negative for OXA-23 were considered unique strains by REP-PCR and PFGE.

The MIC of imipenem was determined for at least one isolate of each REP-PCR clonal group. Twenty one isolates showed MIC \geq 12 μ g/mL and of these, 10 presented MIC \geq 32 μ g/mL (table 2). Only one isolate had MIC $<$ 4 μ g/mL and this was considered an unique strain by molecular typing.

DISCUSSION

In this study, we were able to show that patients infected by CRAb in ICUs, were mainly males with more than 50 years. Also, we found that 83.5% of these patients underwent mechanical ventilation and 95.2% received antibiotics prior the isolation of CRAb. These results are in accordance with other reports showing that previous antimicrobial exposure and the use of mechanical ventilation are the main risk factors for infection by CRAb [5, 6, 24, 25].

As we included only CRAb isolates in this study and all of them proved to be MDR, it is possible say that the resistance to carbapenems is associated to other resistance mechanisms such overexpression efflux-pumps that which may other antibiotics [21] .

The use of PCR-based technique to determine the genetic relationship among isolates has increased in recent years as it provided faster results than PFGE [16, 17]. In our study, the REP-PCR showed similar results to PFGE. Although we have found some conflicting results between REP-PCR and PFGE, there was complete agreement between both methods for the 8 major clonal groups. This fact demonstrates that the REP-PCR method can be used as an alternative typing tool for rapid identification of epidemic strains.

We detected three common clonal groups by REP-PCR among the five different hospitals in this study it indicating inter-hospital spread of CRAb [4, 11, 12]. The clonal groups 3 and 4 were the most prevalent in all hospitals except in hospital five were the clonal group 7 was the most prevalent.

In fact, inter-hospital spread of CRAb can be associated to transfer of infected and/or colonized patients from one hospital to another. This was reported previously in France, England, Netherlands, USA and Colombia [8-10, 13, 18]. We were not able to identify the dynamics of dissemination of CRAb among different institutions, but they could have emerged, over time, from a common ancestor that due to its genetic plasticity and ability to acquire antibiotic resistance, different clones may have been generated [12].

In addition, we observed a seasonal distribution of CRAb with peaks related to summer months (January to March, 2008). This may be explained by the fact that bacterial growth may be enhanced at high room temperatures [1]. In opposition to this, there was an increase in the number of CRAb cases at Hospital 5 in June 2008 when twelve cases have been reported in this hospital.

The present study showed that during one year CRAb was not eradicated in hospitals from Porto Alegre and this suggests that there was to an endemic situation in our city. However, it was also possible to observe that occurred “mini-outbreaks” in period of this study (fig.1). Contamination of the environment seems to have a major role in situation of outbreak where multiple clones are identified [9]. In this case, control measures such active surveillance, intensified hand hygiene, contact precaution with patient isolation or cohort, intensified cleaning and disinfection of the environment, must be taken to contain the spread as already reported in other studies [1, 2, 4]. Most of these measures were used in the hospitals included in this study. However, it is difficult to maintain the same level of commitment of health professionals with infection control procedures and, therefore, the number of cases tended to increase again. Thus, monitoring of endemic and epidemic strains by molecular typing is crucial to control and prevents spreading of CRAb.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank the health professionals who notified and investigated their cases and thus contributed to strengthening the Healthcare-acquired infection surveillance information system of the city of Porto Alegre, Brazil. This study was supported in part by the National Institute of Science and Technology (Edital Universal nº 14/2008) National Institute of Science and Technology for Health Technology Assessment (IATS) - CNPq/Brazil and Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERENCES

- [1] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 21 (3):538-582
- [2] Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H (2007) An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 5 (12):939-951
- [3] Maragakis LL, Perl TM (2008) *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis 46 (8):1254-1263
- [4] Karageorgopoulos DE, Falagas ME (2008) Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Lancet Infect Dis 8 (12):751-762
- [5] Falagas ME, Karveli EA, Siempos, II, Vardakas KZ (2008) *Acinetobacter* infections: a growing threat for critically ill patients. Epidemiol Infect 136 (8):1009-1019
- [6] Srinivasan VB, Rajamohan G, Pancholi P, Stevenson K, Tadesse D, Patchanee P, Marcon M, Gebreyes WA (2009) Genetic relatedness and molecular

characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 8:21

[7] Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Penteado-Filho SR, Livermore DM, Woodford N (2003) Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 41 (7):3403-3406

[8] Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, Palepou MF, Pike R, Pitt TL, Patel BC, Livermore DM (2006) Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol* 44 (10):3623-3627

[9] van den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, De Brauwier E, Mascini EM, van der Reijden TJ, Spanjaard L, Thewessen EA, van der Zee A, van Zeijl JH, Dijkshoorn L (2006) Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. *Clin Microbiol Infect* 12 (9):837-843

[10] Landman D, Butnariu M, Bratu S, Quale J (2009) Genetic relatedness of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. *Epidemiol Infect* 137 (2):174-180

[11] van den Broek PJ, van der Reijden TJ, van Strijen E, Helmig-Schurter AV, Bernards AT, Dijkshoorn L (2009) Endemic and epidemic acinetobacter species in a university hospital: an 8-year survey. *J Clin Microbiol* 47 (11):3593-3599

[12] Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, van der Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell J (2007) Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 45 (2):453-460

[13] Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, Livermore D, Quinn JP (2007) Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (6):2001-2004

- [14] Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, Machado AB, Barth AL (2009) Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme: Dissemination in Southern Brazil. *Infect* 37:474-476
- [15] Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD (2009) Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 34 (1):25-28
- [16] Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J (2000) PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 6 (12):635-643
- [17] Martin-Lozano D, Cisneros JM, Becerril B, Cuberos L, Prados T, Ortiz-Leyba C, Canas E, Pachon J (2002) Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Clin Microbiol* 40 (12):4571-4575
- [18] Fontana C, Favaro M, Minelli S, Bossa MC, Testore GP, Leonardis F, Natoli S, Favalli C (2008) *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates. *BMC Infect Dis* 8:79
- [19] In: www.cnes.datasus.gov.br. (11/01/2010)
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S17 (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth information supplement. : Wayne, PA : CLSI.

- [21] Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, Gales AC (2010) Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8 (1):71-93
- [22] Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 27 (4):351-353
- [23] Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ (2006) Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* 19 (3):512-530
- [24] Oteo J, Garcia-Estebanez C, Miguelanez S, Campos J, Marti S, Vila J, Dominguez MA, Docobo F, Larrosa N, Pascual A, Pintado V, Coll P (2007) Genotypic diversity of imipenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Spain. *J Infect* 55 (3):260-266
- [25] Lin MF, Yang CM, Lin CH, Huang ML, Tu CC, Liou ML (2009) Clinical features and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-A baumannii* complex in a regional teaching hospital in Taiwan. *Am J Infect Control* 37 (9):e1-3

Table 1. Clinical Characteristics of patients infected by *Acinetobacter* sp.

Variable	N (%)
Sex	
Male	106 (60.8)
Age, years (Mean, SV 55.46 ± 19.15)	
0-14	7 (3.0)
15-50	12 (29.8)
51-99	160 (66.8)
Length of stay, days (Mean, SV 21.3 ± 17.5)	
Invasive Procedure*	
CVC	218 (90.8)
SV	213 (88.9)
VM	200 (83.5)
Surgery	134 (55.9)
Underlying Disease	
Chronic lung disease	58 (24.0)

Continuation Table 1.

Heart disease	82 (39.2)
Trauma	31 (10.3)
Diabetes	48 (19.9)
Imunossuppression	31 (13.0)
Chronic kidney disease	74 (30.9)
Cerebrovascular disease	32 (13.4)
Antibiotic exposure in previous 90 days**	228 (95.2)
Third generation cephalosporins	67 (27.9)
Carbapenems	94 (39.1)
Polimixin	12 (5.0)
Quinolones	66 (27.5)
Other	3 (1.25)

*CVC: central venous catheter; SV: vesical catheter; VM: mechanical ventilation

**Use of antibiotic before diagnostic infection by CRAb

Table 2. Characteristics of Eight Majority Clonal Groups of *A. baumannii*

PFGE Clonal Group (n)	REP-PCR Clonal Group (n)	Hospital	MIC [$\mu\text{g/mL}$] (n)
A (5)	4 (54)	1,2,3,4,5	> 32 (4)
C (10)	3 (31)	1,2,3,4,5	> 32 (3)
E (2)	2 (16)	1, 2, 3, 4	16 (2)
F (8)	1 (13)	2,3,5	> 32 (2)
G (1)	5 (11)	1,2,4,5	16 (1)
H (3)	13 (12)	2,3,4,5	24 (3)
I (3)	7 (27)	2,3,4,5	16 (3)
O (1)	11 (11)	1, 2,3,4,5	> 32 (1)

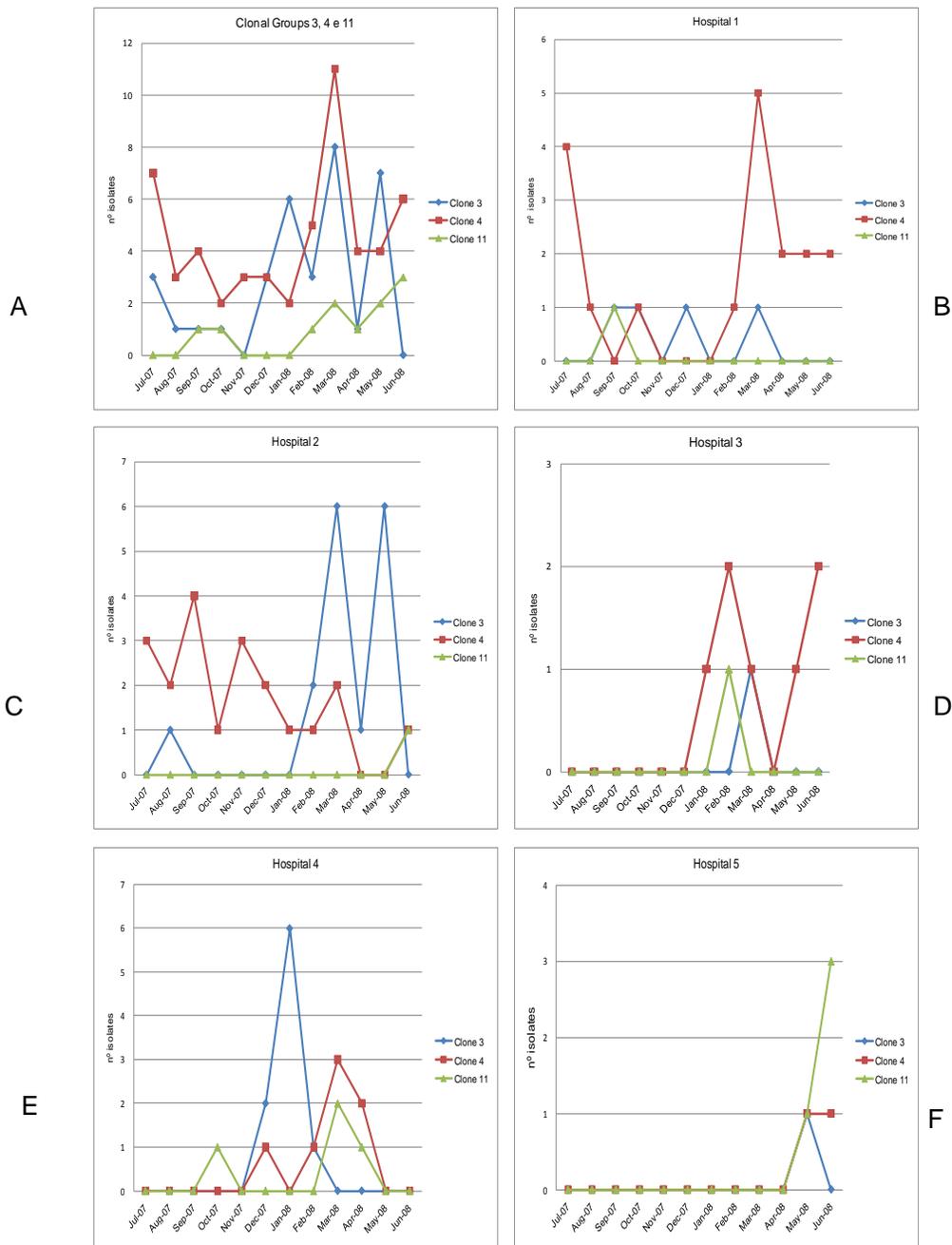


Figure 1. Distribution of 3 major REP-PCR clonal groups among hospitals. A –General Distribution; B- Hospital 1; C-Hospital 2; D- Hospital 3; E-Hospital 4 e F- Hospital 5.

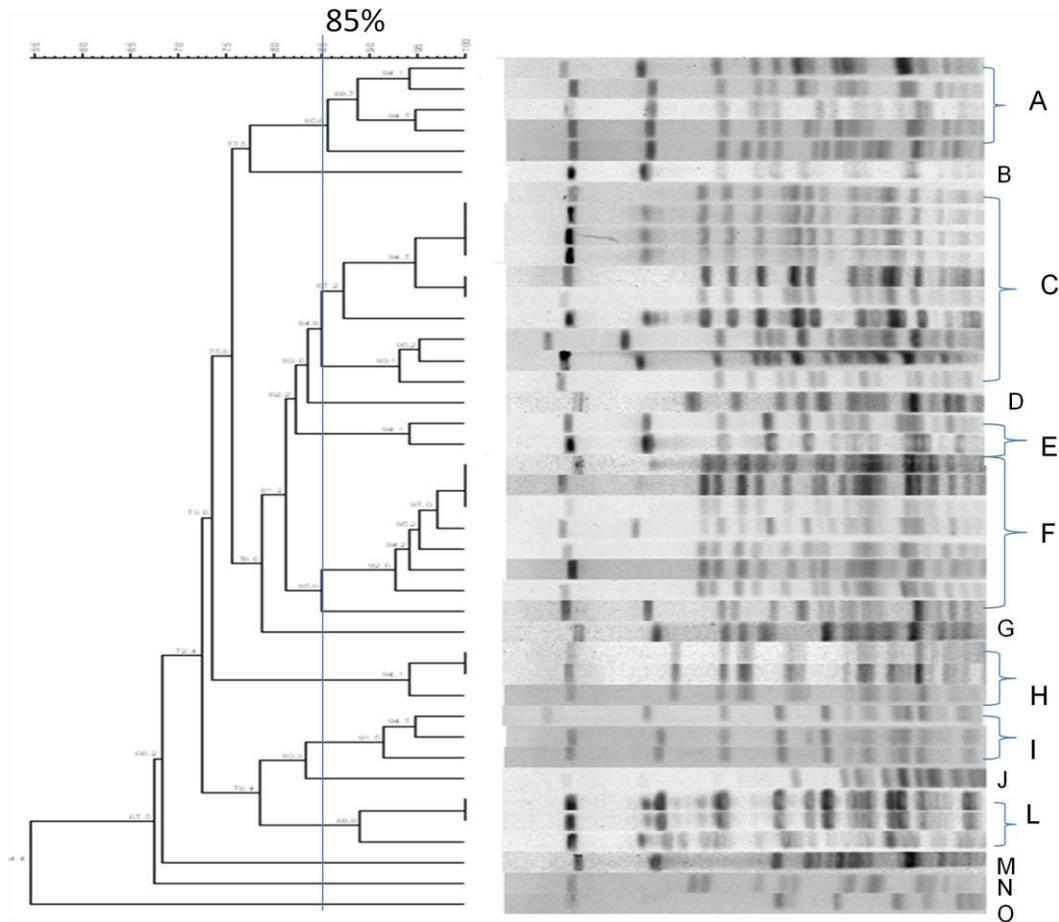


Figure 2. PFGE dendrogram of isolates representative of different groups by REP-PCR. H1-H5 representing isolates from each hospital. The dendrogram was obtained with the unweighted paired group method using arithmetic averages (UPGMA) Genetic similarity was calculated by Dice coefficient. Cut-off for clusters determination was established at 85% similarity level (line). A-O representing each clonal group.

10.4. Artigo 2 em Português

Para ser submetido ao European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease

Co-circulação de diferentes clones de *Acinetobacter baumannii* produtores do gene *bla*_{OXA-23} em hospitais do sul do Brasil

A. F. Martins¹, L. Massi², K. O. Pilger³, M. Pagano⁴, F. Paris^{1,3}, L. Pretto², A. B. M. P. Machado³, A. L. Barth^{1,3}

1. A. F. Martins, A. L. Barth (Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil)

2. L. Massi, L. Pretto (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil)

3. F. Paris, A.B.P. Machado, A. L. Barth (Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre)

4. M. Pagano (Centro Universitário IPA Metodista)

Corresponding author: Andreza Francisco Martins - Endereço: Coordenadoria de Vigilância em Saúde de Porto Alegre. Av. Padre Cacique, 372/3. Cep: 90000-000. Porto Alegre – RS. Brasil. Faz: 55(51) 32892434. Email: andreza_20@pop.com.br or andrezafm@sms.prefpoa.com.br

RESUMO

Introdução: *Acinetobacter baumannii* tem sido freqüentemente associado a surtos em UTIs na última década. A habilidade de adquirir resistência aos antimicrobianos em particular aos carbapenêmicos, bem como de disseminar-se entre os pacientes, está relacionada a capacidade de causar surtos. O objetivo deste estudo foi avaliar a disseminação de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos na cidade de Porto Alegre através da tipagem molecular.

Métodos: 240 isolados de *A. baumannii* das UTIs de cinco hospitais, foram recuperados de Julho de 2007 a Junho de 2008. PCR foi usada para identificar a presença dos genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}. REP-PCR e PFGE foram usados para a tipagem molecular.

Resultados: Os isolados foram coletados principalmente de homens com mais de 50 anos e submetidos à ventilação mecânica. Vinte e dois grupos clonais foram obtidos por REP-PCR e quatorze por PFGE usando *cut-off* de 85% para estabelecer o nível de similaridade. Oito grupos clonais majoritários foram obtidos por tipagem molecular e 3 destes foram encontrados em todos os hospitais.

Conclusão: A presença de 3 clones majoritários em todos os hospitais demonstra a disseminação inter-institucional de *A. baumannii*. O REP-PCR é um método alternativo bom e rápido para a tipagem. O monitoramento de cepas epidêmicas por métodos moleculares é muito importante para prevenir ou reduzir sua disseminação. **Palavras-Chaves:** REP-PCR, PFGE, *A. baumannii*, resistência aos carbapenêmicos

INTRODUÇÃO

Microrganismos oportunistas tais como *Acinetobacter* sp. tem emergido em anos recentes como patógenos nosocomiais importantes principalmente devido a multi-resistência. *Acinetobacter baumannii* também tem características especiais tais como a resistência a dessecação, a habilidade de sobreviver por longos períodos de tempo em superfícies secas e a propensão para adquirir determinantes de resistência a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos [1, 2].

Os carbapenêmicos foram a terapia de escolha para tratar infecções graves causadas por *Acinetobacter baumannii* [3]. Entretanto, surtos relacionados à *A. baumannii* produtor de carbapenemases, especialmente oxacilinases, têm sido amplamente relatados [1, 4]. Pacientes que se submetem a procedimentos invasivos, imunocomprometidos e hospitalizados em UTI são os mais afetados [5]. Infecções comuns incluem pneumonia associada a ventilação mecânica e bacteremia [3].

Diferentes países tem relatado a ocorrência de cepas distintas de *A. baumannii*-resistente aos carbapenêmicos (CRAb) relacionadas a surtos hospitalares que podem ser endêmicas, epidêmicas ou esporádicas [6-10]. Cepas epidêmicas idênticas têm sido encontradas co-circulando com cepas esporádicas em diferentes hospitais [11, 12]. A capacidade de algumas cepas tornarem-se epidêmicas pode estar relacionada a fatores de virulência e a resistência a múltiplos antibióticos [2]. Muitos destes surtos têm sido atribuídos a expressão de

oxacilinases e entre elas, o gene *bla*_{OXA-23} é o mais amplamente disseminado no mundo [1, 8, 13]. Na última década, alguns estudos também tem relatado a disseminação do gene *bla*_{OXA-23} entre hospitais de diferentes cidades no Brasil [7, 14, 15].

Métodos de tipagem molecular têm sido usados para definir a relação genética entre isolados de diferentes fontes. A *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) de fragmentos de DNA tem um elevado poder discriminatório, entretanto é muito trabalhosa e onerosa [1, 16, 17]. Assim, métodos de tipagem baseados em PCR como o REP-PCR têm se tornado uma alternativa ao PFGE para tipagem de *A. baumannii* [17, 18].

Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a disseminação de CRAb entre diferentes hospitais em nossa cidade através das técnicas de REP-PCR e PFGE.

MATERIAIS E MÉTODOS

Características da Amostra

Este estudo foi realizado em Porto Alegre (PA), sul do Brasil, de Julho de 2007 a July de 2008. PA é uma cidade com 1.4 milhões de habitantes e 7223 leitos hospitalares, dos quais 1017 são de UTI [19]. No período do estudo, a Coordenadoria de Vigilância em Saúde local foi notificada da ocorrência de 408 casos de infecção provenientes de 393 pacientes em UTI. Nós avaliamos 240 isolados de *Acinetobacter* sp. resistentes aos carbapenêmicos provenientes de UTIs de 5 hospitais que representaram 61% do número total de casos de CRAb.

Isolados e Testes de Susceptibilidade

Isolados de *Acinetobacter* sp. foram obtidos de diferentes materiais clínicos coletados somente de pacientes internados em UTIs. Apenas 1 isolado por paciente foi incluído. A identificação do microrganismo foi inicialmente realizada pelo API 20NE (BioMerieux Basingstoke, United Kingdom) ou Vitek 2 (BioMerieux Basingstoke, United Kingdom). Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados por disco-difusão de acordo com as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) [20]. Os isolados foram considerados multirresistentes (MDR) quando demonstraram resistência a mais de 3 classes de antimicrobianos e pan-resistentes (PAN-R) quando demonstraram resistência a todos os antimicrobianos testados, exceto colistina [21]. A CIM do imipenem foi estabelecida usando MICE[®] (Oxoid). PCR para o gene *bla*_{OXA-51} foi realizada em todos os isolados para identificar *A. baumannii*. Os isolados foram coletados e armazenados em caldo glicerol a -80°C.

PCR para Oxacilinas

A presença dos genes codificando para *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} foi detectada usando Multiplex PCR como descrito previamente com mínimas modificações [22]. Controles Positivos incluíram cepas de *Acinetobacter* sp. caracterizadas como produtoras das enzimas OXA-23, OXA-24 e OXA-58 através de seqüenciamento, e uma cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 (controle negativo para OXA-23, OXA-24 e OXA-58) como controle positivo para OXA-51-like (intrínseco da espécie *A. baumannii*).

Tipagem Molecular

Os isolados positivos para OXA-23-like e OXA-51-like foram selecionados para genotipagem por REP-PCR usando os *primers* REP-1 e REP-2 . REP-PCR foi realizada como previamente descrito [16]. As condições de amplificação usadas foram às seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 10min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1min, anelamento a 43°C por 1min, extensão a 72°C por 1min e uma extensão final a 72°C por 16 min. Os produtos de REP-PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose (2%) em 0,5X TBE. Pelo menos um isolado de cada grupo clonal obtido por REP-PCR foi analisado por PFGE usando o equipamento CHEF-DRII com a endonuclease de restrição *ApaI* [16]. Análise dos padrões de PFGE foram feitas no software BioNumerics versão 6.0 a partir da fotografia do gel marcado com brometo de etídio. Isolados foram considerados pertencentes a um mesmo grupo (grupo clonal) quando a similaridade entre eles foi maior do que 85% após a construção do dendrograma calculado a partir do coeficiente de Dice [23]. A matriz de similaridade foi definida através do método de agrupamento usando média aritmética não-ponderada (UPGMA).

RESULTADOS

No período deste estudo, nós avaliamos 240 isolados de *Acinetobacter* sp. de pacientes em UTI de cinco hospitais de Porto Alegre: 41 (17,1%) hospital 1, 118 (49,16%) hospital 2, 24 (10,0%) hospital 3, 32 (13,33%) hospital 4 e 25 (10,41%) hospital 5. A maioria dos isolados (162 – 67,5%) foi obtida do trato respiratório inferior, seguido por isolados do sangue (23 – 9,58%), urina (20 –

8,33%), ferida operatória (2 – 0,84%) e outros (33-13,75%). Cento e seis (60,8%) isolados foram obtidos de homens com idade média de $55,46 \pm 19,15$ anos (média \pm DP). O tempo até o diagnóstico foi de $21,3 \pm 17,5$ dias (média \pm SD) e 62 (26%) dos pacientes foram hospitalizados nos últimos 90 dias (tabela 1). Nota-se que, 200 (83,5%) pacientes fizeram uso de ventilação mecânica e 228 (95,2%) receberam antimicrobianos antes do diagnóstico da infecção por *Acinetobacter* sp. Os carbapenêmicos foram os antimicrobianos mais prescritos seguido pelas cefalosporinas de 3ª geração e quinolonas (table 1). Dos 240 isolados, 139 (58%) foram considerados MDR e 101 (42%) foram considerados PAN-R. A maioria dos isolados PAN-R (69 -68,3%) foi obtida do hospital 2.

Nós identificamos o gene *bla*_{OXA-23-like} em 238 (99,0%) isolados e o gene *bla*_{OXA-51-like} em 239 (99,6%). Um total de 211 isolados de CRAB (todos positivos para *bla*_{OXA-51-like}) foram submetidos a tipagem molecular por REP-PCR e foi possível identificar 22 grupos clonais. De acordo com REP-PCR a maioria dos isolados 175 (83%) foram incluídos em 8 grupos clonais (tabela 2) cada um contendo pelo menos 10 isolados. Em contrapartida, 8 grupos clonais tiveram apenas um isolado.

Três grupos clonais obtidos por REP-PCR (clones 3, 4 e 11) foram identificados em todos os hospitais (tabela 2). A distribuição destes clones ao longo do tempo em cada hospital, indica que o clone 4 foi mais prevalente em março de 2008 (figura 1). Nota-se que os clones 3 e 4 foram mais prevalentes no período do verão (Janeiro, Fevereiro e Março de 2008) enquanto que o clone 11

apresentou uma distribuição mais regular e o número de casos começou a aumentar em maio de 2008 (fig. 1A). O aumento no número de isolados pertencentes ao clone 11 em maio de 2008 foi associado a um surto que ocorreu no hospital 5 (fig. 1F). O número de isolados pertencentes aos clones 3 e 4 oscilaram durante o período do estudo nos diferentes hospitais (fig. 1B-E).

Quarenta e um isolados representantes de cada um dos 22 grupos clonais obtidos por REP-PCR foram tipados por PFGE (figura 2) e catorze grupos clonais foram obtidos. Todos os isolados dos oito grupos clonais majoritários por REP-PCR foram agrupados de modo semelhante por PFGE e todos foram positivos para os genes *bla*_{OXA-23}. Dois isolados que foram negativos para o gene *bla*_{OXA-23} foram considerados cepas únicas por REP-PCR e PFGE.

A CIM do imipenem foi determinada para pelo menos um isolado de cada grupo clonal. Vinte e um isolados apresentaram resultados de CIM ≥ 12 $\mu\text{g/mL}$ e destes, dez isolados tiveram CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 2). Somente um isolado teve CIM < 4 $\mu\text{g/mL}$ e este foi considerado como uma cepa única.

DISCUSSÃO

Neste estudo, nós mostramos que pacientes afetados por CRAb em UTI foram principalmente homens com mais de 50 anos. Nós também encontramos que 83,5% dos pacientes foram submetidos à ventilação mecânica e 95,2% receberam antimicrobianos antes do isolamento de CRAb. Estes resultados concordam com outros relatos mostrando que a exposição prévia a

antimicrobianos e o uso de ventilação mecânica são os principais fatores de risco para infecção por CRAb [5, 6, 24, 25].

Como nós incluímos somente isolados de CRAb neste estudo e todos eles foram considerados MDR, é possível dizer que a resistência aos carbapenêmicos está associada a outros mecanismos de resistência tais como a hiperexpressão de bombas de efluxo que podem afetar outros antimicrobianos [21].

O uso de técnicas baseadas em PCR para determinar a relação genética entre isolados tem aumentado nos últimos anos, pois se obtém resultados mais rápidos do que PFGE [16, 17]. No nosso estudo, o REP-PCR apresentou resultados similares a PFGE. Embora nós tenhamos encontrado alguns resultados conflitantes entre REP-PCR e PFGE, houve uma total concordância entre ambos os métodos para os 8 grupos clonais majoritários. Este fato demonstra que o método de REP-PCR pode ser usado como uma ferramenta alternativa de tipagem para identificação rápida de cepas epidêmicas.

Nós detectamos três grupos clonais comuns por REP-PCR entre os 5 hospitais neste estudo e isto indica uma disseminação de CRAb inter-hospital [4, 11, 12]. Os grupos clonais 3 e 4 foram os mais prevalentes em todos os hospitais exceto no hospital 5 cujo grupo mais prevalente foi o 7.

Na realidade, a disseminação de CRAb inter-hospital pode estar associada a transferência de pacientes infectados/colonizados de um hospital para o outro. Isto foi relatado previamente na França, Inglaterra, Holanda, Estados Unidos e Colômbia [8-10, 13, 18]. Nós não identificamos a dinâmica de disseminação de

CRAb entre as diferentes instituições, mas eles podem ter emergido, ao longo do tempo, de um ancestral comum que devido a sua plasticidade genética e habilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos, diferentes clones podem ter sido gerados [12].

Em adição, nós observamos uma distribuição sazonal de CRAb com aumento de casos nos meses de verão (janeiro a março de 2008). Este fato pode ser explicado, pois o crescimento bacteriano pode ser favorecido em temperaturas mais elevadas [1]. Ao contrário disto, houve um aumento no número de casos de CRAb no hospital 5 em Junho de 2008 quando doze casos foram relatados neste hospital.

O presente estudo mostrou que durante um ano CRAb não foi erradicado dos hospitais de Porto Alegre e isto sugere que existe uma situação endêmica em nossa cidade. Entretanto, também foi possível observar que ocorreram “mini-surtos” no período do estudo (figura 1). A contaminação do ambiente tem sido vista com um papel muito importante em situações de surtos onde múltiplos clones são identificados [9]. Nestes casos, medidas de controle como vigilância ativa, intensificação da higienização de mãos, precaução de contato com pacientes isolados ou admitidos em cohorte, intensificação da limpeza e desinfecção do ambiente, precisam ser tomadas para conter a disseminação como relatado em outros estudos [1, 2, 4]. Muitas destas medidas foram usadas nos hospitais incluídos neste estudo. Entretanto, é difícil manter o mesmo nível de comprometimento dos profissionais de saúde com os procedimentos de controle

de infecção e, portanto, o número de casos tende a aumentar novamente. Assim, o monitoramento de cepas endêmicas e epidêmicas através da tipagem molecular é crucial para controlar e prevenir a disseminação de CRAb.

O monitoramento de cepas endêmicas e epidêmicas por tipagem molecular é crucial para controlar e prevenir a disseminação de CRAb. Nós também entendemos que um sistema de informações centralizado capaz de orientar os hospitais individualmente sobre os pacientes quando estes são atendidos em vários hospitais e podem ser vetores de CRAb [3, 30], se faz necessário.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos aos profissionais de saúde que notificaram e investigaram seus casos e contribuíram fortemente para o sistema de informação e vigilância das Infecções Adquiridas em Estabelecimentos de Saúde, na cidade de Porto Alegre, Brasil. Este estudo recebeu recursos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia ((Edital Universal nº 14/2008) - CNPq/Brazil e do Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERÊNCIAS

- [1] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 21 (3):538-582
- [2] Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H (2007) An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 5 (12):939-951

- [3] Maragakis LL, Perl TM (2008) *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis 46 (8):1254-1263
- [4] Karageorgopoulos DE, Falagas ME (2008) Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Lancet Infect Dis 8 (12):751-762
- [5] Falagas ME, Karveli EA, Siempos, II, Vardakas KZ (2008) *Acinetobacter* infections: a growing threat for critically ill patients. Epidemiol Infect 136 (8):1009-1019
- [6] Srinivasan VB, Rajamohan G, Pancholi P, Stevenson K, Tadesse D, Patchanee P, Marcon M, Gebreyes WA (2009) Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA. Ann Clin Microbiol Antimicrob 8:21
- [7] Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Pentead-Filho SR, Livermore DM, Woodford N (2003) Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. J Clin Microbiol 41 (7):3403-3406
- [8] Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, Palepou MF, Pike R, Pitt TL, Patel BC, Livermore DM (2006) Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. J Clin Microbiol 44 (10):3623-3627
- [9] van den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, De Brauwier E, Mascini EM, van der Reijden TJ, Spanjaard L, Thewessen EA, van der Zee A, van Zeijl JH, Dijkshoorn L (2006) Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. Clin Microbiol Infect 12 (9):837-843
- [10] Landman D, Butnariu M, Bratu S, Quale J (2009) Genetic relatedness of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. Epidemiol Infect 137 (2):174-180

- [11] van den Broek PJ, van der Reijden TJ, van Strijen E, Helmig-Schurter AV, Bernards AT, Dijkshoorn L (2009) Endemic and epidemic acinetobacter species in a university hospital: an 8-year survey. *J Clin Microbiol* 47 (11):3593-3599
- [12] Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, van der Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell J (2007) Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 45 (2):453-460
- [13] Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, Livermore D, Quinn JP (2007) Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (6):2001-2004
- [14] Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, Machado AB, Barth AL (2009) Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme: Dissemination in Southern Brazil. *Infect* 37:474-476
- [15] Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD (2009) Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 34 (1):25-28
- [16] Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J (2000) PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 6 (12):635-643
- [17] Martin-Lozano D, Cisneros JM, Becerril B, Cuberos L, Prados T, Ortiz-Leyba C, Canas E, Pachon J (2002) Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Clin Microbiol* 40 (12):4571-4575

- [18] Fontana C, Favaro M, Minelli S, Bossa MC, Testore GP, Leonardis F, Natoli S, Favalli C (2008) *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates. BMC Infect Dis 8:79
- [19] In: www.cnes.datasus.gov.br. (11/01/2010)
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S17 (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth information supplement. : Wayne, PA : CLSI.
- [21] Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, Gales AC (2010) Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Rev Anti Infect Ther 8 (1):71-93
- [22] Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 27 (4):351-353
- [23] Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ (2006) Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 19 (3): 512-530
- [24] Oteo J, Garcia-Estebanez C, Miguelanez S, Campos J, Marti S, Vila J, Dominguez MA, Docobo F, Larrosa N, Pascual A, Pintado V, Coll P (2007) Genotypic diversity of imipenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Spain. J Infect 55 (3):260-266
- [25] Lin MF, Yang CM, Lin CH, Huang ML, Tu CC, Liou ML (2009) Clinical features and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-A baumannii* complex in a regional teaching hospital in Taiwan. Am J Infect Control 37 (9):e1-3

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes infectados por *Acinetobacter* sp.

Variável	N (%)
Sexo	
Masculino	106 (60,8)
Idade, anos (média, DP 55,46 ± 19,15)	
0-14	7 (3,0)
15-50	12 (29,8)
51-99	160 (66,8)
Tempo até diagnóstico,dias (média, DP 21,3 ±17,5)	
Procedimento Invasivo*	
CVC	218 (90,8)
SV	213 (88,9)
VM	200 (83,5)
Cirurgia	134 (55,9)
Co-morbidades	

Continuação Tabela 1.

Doença Respiratória	58 (24,0)
Doença Cardíaca	82 (39,2)
Trauma	31 (10,3)
Diabetes	48 (19,9)
Imunossupressão	31 (13,0)
Doença Renal	74 (30,9)
Doença Neurológica	32 (13,4)
Uso prévio de antimicrobianos**	228 (95,2)
Cefalosporina de 3 ^a ger.	67 (27,9)
Carbapenêmico	94 (39,1)
Polimixina	12 (5,0)
Quinolona	66 (27,5)
Outro	3 (1,25)

*CVC- cateter venoso central; SV- sonda vesical; VM – ventilação mecânica

** Uso de antimicrobianos na internação atual, antes do diagnóstico de infecção por CRAb

Tabela 2. Características dos Principais Grupos Clonais de *A. baumannii*

Grupo Clonal PFGE (n)	Grupo Clonal REP-PCR (n)	Hospital	MIC [$\mu\text{g/mL}$] (n)
A (5)	4 (54)	1,2,3,4,5	> 32 (4)
C (10)	3 (31)	1,2,3,4,5	> 32 (3)
E (2)	2 (16)	1, 2, 3, 4	16 (2)
F (8)	1 (13)	2,3,5	> 32 (2)
G (1)	5 (11)	1,2,4,5	16 (1)
H (3)	13 (12)	2,3,4,5	24 (3)
I (3)	7 (27)	2,3,4,5	16 (3)
O (1)	11 (11)	1, 2,3,4,5	> 32 (1)

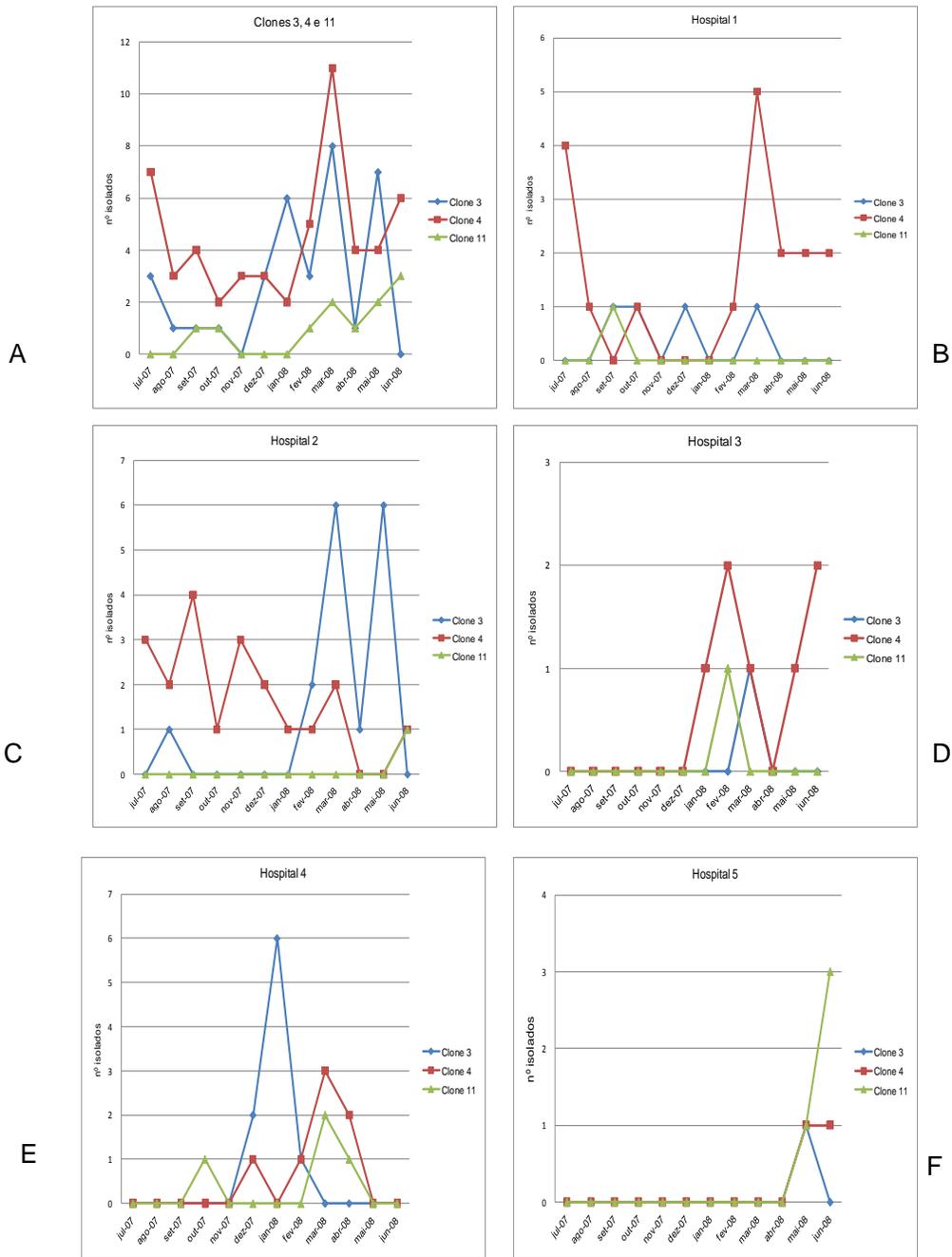


Figura 1. Distribuição dos 3 principais grupos clonais obtidos por REP-PCR entre os hospitais. A- Distribuição Geral; B- Hospital 1; C-Hospital 2; D-Hospital 3; E-Hospital 4 e F-Hospital 5.

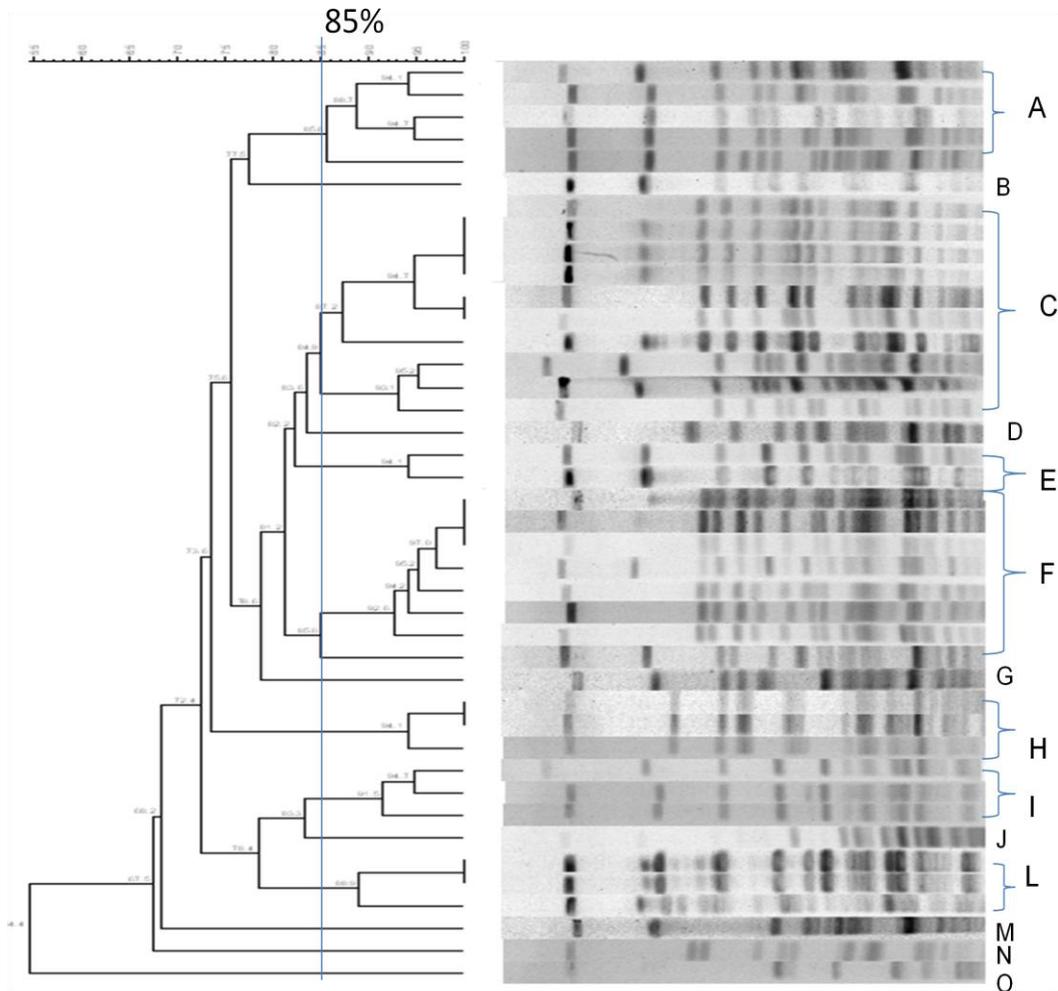


Figura 2. Dendrograma de PFGE dos isolados representativos dos diferentes grupos clonais de REP-PCR. O dendrograma foi obtido através do método de agrupamento usando média aritmética não-ponderada (UPGMA). Similaridade Genética foi calculada pelo coeficiente de Dice. Cut-off de 85% de similaridade foi usado para definição dos Grupos clonais (linha). A-O representam cada um dos grupos clonais obtidos.

10.5. Artigo 3 em Inglês

Submitted to Infection Control Hospital Epidemiology in 1st March 2010

High Endemic Levels of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* amongst hospitals in Southern Brazil

Short title: High Endemic Levels of Multidrug-Resistant A. baumannii

Authors: Andreza F. Martins, Ms¹; Ricardo S. Kuchenbecker, MD, PhD² Andrea Gomes, PhD³; Anelise Breier, Ms³; Afonso L. Barth, PhD⁴; and CMCIES-PMPA/SMS Task Force⁵

1. and 3. Department of Surveillance Health, Porto Alegre, Brazil

2. Hospital Infection Control Committee, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

4. Microbiology and Molecular Biology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

5.CMCIES-PMPA/SMS Task Force:

Andreza Francisco Martins Anelise Breier and Mariza Ochoa Favarini (Department Of Surveillance Health); Beatriz Azambuja Baptista (Grupo Hospitalar Conceição); Carla Maria Oppermann (Hospital De Pronto Socorro); Cassiana Gil Prates (Hospital Ernesto Dornelles); Lahir Chaves Dias (Grupo Hospitalar Conceição); Juliana Gil Prates (Hospital Mãe De Deus); Nádia Kuplich (Hospital De Clínicas De Porto Alegre); Ricardo S. Kuchenbecker (Hospital De Clínicas De Porto Alegre); Teresa C. Sukiennik (Complexo Hospitalar Santa Casa De Porto Alegre)

Corresponding author: Andreza Francisco Martins - Department of Surveillance Health, Porto Alegre, Brazil. 372/3 Padre Cacique Avenue, 90810240- Porto Alegre/RS, Brazil. andrezafm@sms.prefpoa.com.br

Abstract

The most published data on Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDR Ab) originates from outbreaks. We report prevalence trends on Healthcare-acquired infections due to MDR *A. baumannii* during 18 months in the city of Porto Alegre, southern of Brazil. The higher rates of infection due to MDR-*A. baumannii* were found in ICU.

Background

To the best of our knowledge, the most published studies reporting data on Healthcare-acquired infections (HAI) due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDR *A. baumannii*) originated from outbreaks [1]. Only few studies estimated endemic hospital MDR *A. baumannii* prevalence rates in non-outbreak settings [2, 3]. Such information is relevant to estimate set-points for endemic and epidemic levels, and to provide further evidence related to the impact of implemented measures for eradicating /reducing MDR *A. baumannii* strains. In the context of an outbreak involving several hospitals, MDR *A. baumannii* prevalence rates may enable to describe trends from different institutions.

In Brazil, MDR *A. baumannii* has emerged as a nosocomial pathogen since 1993, mainly at Intensive Care Units (ICU), resulting in an endemic pathogen [4], and now is acknowledged as an important cause of morbidity. These opportunistic pathogens are responsible for ventilator-associated pneumonia, bacteremia, surgical wound and urinary tract infections, etc [1].

Porto Alegre is a city with 1.4 million inhabitants and 7,223 hospital beds including public and private hospitals [5]. The first MDR *A. baumannii* case was reported in 2004 in a large medical-surgical hospital. In early 2007, several hospitals reported MDR *A. baumannii* cases and four ICUs were closed due to MDR *A. baumannii* outbreaks in the following 18 months. On that period, 18 hospitals reported MDR *A. baumannii* cases, with documented clonal cross-dissemination in at least part of the affected city hospitals. Local Health Department established a task force to monitor MDR *A. baumannii* HAI through a mandatory notification system.

Methods

We obtained all consecutive reported data from MDR *A. baumannii* HAI cases notified to the information system in the city from July 1st, 2007 to December 31st, 2008. The local Health Department case notification system provided information on demographic, clinical findings and outcome of HAI related to MDR *A. baumannii*. Case definition included Infection that occurred more than 48 hours after hospital admission in accordance with CDC criteria [6]. To avoid duplication of repeated notifications from the same patient, only the first notification of each patient was considered.

HAI MDR *A. baumannii* prevalence rates from each hospital were obtained dividing the number of notified cases by the amount of inpatient-days at each institution. The city surveillance system was created as one of several interventions promoted jointly by affected hospitals under the leadership of the

local Health Department. Those initiatives included reassurance of infection and control policies targeting eradication/reduction of MDR *A. baumannii* cases.

The identification of MDR *A. baumannii* was performed using an automated identification system and standard phenotypic reference methods. For purposes of this study was considered *A. baumannii* as all species belonging to the *A. baumannii-calcoaceticus* complex and MDR *A. baumannii* were all isolates resistant to more than three classes of antimicrobials, including carbapenems [1].

Isolates from five hospitals that were confirmed as MDR *A. baumannii*, were genotyped by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the restriction endonuclease *Apal* and REP-PCR [1, 7].

Results

Six-hundred and nine documented MDR *A. baumannii* HAI were reported from patients attending 18 hospitals during the study period. Most patients (66.5%) were at 51-99 years old range, 61.8% were men, and 54.9% were surgical inpatients when an HAI MDR *A. baumannii* was detected. Most patients used central venous catheter and urinary catheter; respectively 85.2% and 85.3%. Indeed, most patients were submitted to mechanical ventilation (72.4%) and had ventilator-associated pneumonia (77.3%). The use of antimicrobial therapy in the previous 90 days was documented in 95.4% of HAI MDR *A. baumannii* cases. All hospitals documented infections in ICU patients.

A substantial difference on HAI MDR *A. baumannii* rates were observed amongst reporting hospitals (Table 1), varying from 0.4 to 9.0 cases per 1,000

inpatient-days respectively, lowest and highest prevalence rate hospitals. This information was obtained from public hospitals only that it is represented 564 (91.9%) cases (Table 1). Noteworthy, more than one third of all cases in the study period occurred in only one medical-surgical hospital. Trauma hospitals accounted to two of the four highest rates amongst studied hospital, with 9.0 and 4.0 HAI MDR *A. baumannii* rates.

We were able to detect clonal dissemination of MDR *A. baumannii* among 5 hospitals. Moreover, co-circulation of different clones was also identified (data not shown). Interestingly, two of the smallest hospitals (144 and 95 beds) in the study ranked in the top-six affected with high rates of MDR *A. baumannii*.

The rate of HAI MDR *A. baumannii* in all hospitals demonstrated a two-phase pattern distribution in the study period (Figure 1). From July/2007 to April/2008, elevated HAI MDR *A. baumannii* rates were observed, with a substantial increase during summer season (i.e. December/2007 to March/2008). After that, all-hospitals HAI MDR *A. baumannii* rate fell around 50% from April to December/2008, thus characterizing a seasonal distribution [4]. It was observed a substantial reduction on HAI MDR *A. baumannii* rates after the intervention developed amongst affected hospitals despite the wide variation of HAI MDR *A. baumannii* rates between hospitals (Table 1).

Discussion

This is the first report documenting prevalence trends of HAI MDR *A. baumannii* rates within public hospitals involved in a city-wide outbreak. Morgan et al., reported rates from hospitals New York during ten years, but ICU only [8].

Compare to other studies, we rates of HAI MDR *A. baumannii* are highest [8, 9]. The impressive variation of HAI MDR *A. baumannii* rates within public hospitals emphasizes the importance of coordinated efforts (i.e. multiple hospitals) in order to reduce cross-contamination within affected institutions. The observation of small hospitals with elevated HAI MDR *A. baumannii* rates may represent outbreaks heavily concentrated that shall be can be explained by characteristics of these hospitals, the severity of patients and infection prevention and control measures.

Most documented cases occurred in patients with several comorbidities, severe illness and submitted to invasive procedures at ICUs, thus representing an extra burden of disease to chronically overloaded hospitals [1, 10], especially at the resource-constrained settings. As the cases originated from hospitals notifications, these rates may be prone to undernotification of diagnosed HAI MDR *A. baumannii*.

The observed seasonal variation in HAI due to MDR *A. baumannii* may be related to an increased environmental humidity and hot climate which are both favorable for the growth of *A. baumannii* [4], and thus emphasizing the importance of local surveillance strategies to establish the best measures for controlling the outbreak and reducing endemic levels [8]. Indeed, it is important to know endemic

MDR *A. baumannii* levels, not only to prevent new cases but also to understand and to predict patterns of multi-drug resistant bacteria dissemination [1, 8]. Further non-epidemic prevalence studies are needed to provide better understanding of MDR *A. baumannii* patterns of dissemination within hospitals and cross-contamination amongst affected hospitals.

Acknowledgements

We wish to thank the health professionals who notified and investigated their cases and thus contributed to strengthening the Healthcare-acquired infection surveillance information system of the city of Porto Alegre, Brazil. This study was supported in part by the National Institute of Science and Technology (Edital Universal Nº 014/2008), the National Institute of Science and Technology for Health Technology Assessment (IATS) - CNPq/Brazil and Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA).

Conflict of Interest

None to declare.

References

1. Peleg AY, Seifert H, and Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(3): 538-82.
2. Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lai H, Quale J. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis* 2000; 31(1): 101-6.
3. Quale J, Bratu S, Landman D, Heddurshetti R. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin Infect Dis* 2003; 37(2): 214-20.
4. Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin Infect Dis* 2001; 32 Suppl 2: S104-13.
5. Available at: http://www.cnes.datasus.gov.br/Mod_Ind_Tipo_Leito.asp?VEstado=43 &VMun=431490 in 1st december, 2009.
6. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988; 16(3): 128-40.
7. Oteo J, Garcia-Estebanez C, Miguelanez S, et al. Genotypic diversity of imipenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Spain. *J Infect* 2007; 55(3): 260-6

8. Morgan DJ, Weisenberg SA, Augenbraun MH, et al. Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in New York City 10 years into the Epidemic. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30(2): 196-97.
9. van den Broek PJ, van der Reijden TJ, van Strijen E, Helmig-Schurter AV, Bernards AT, Dijkshoorn L. Endemic and epidemic acinetobacter species in a university hospital: an 8-year survey. *J Clin Microbiol* 2009; 47(11): 3593-9.
10. Murray CK and Hospenthal DR. *Acinetobacter* infection in the ICU. *Crit Care Clin* 2008; 24(2): 237-48.

Table 1 – Data on Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates

Hospital	Beds	ICU beds	Reported cases (%)*	Infection rate/1,000 patient-days	Hospital Profile**	Clonal dissemination
8	144	48	74 (12.1)	9.0	Trauma	No
5	840	156	211 (34.7)	5.5	MS	Yes
2	603	108	77 (12.6)	5.1	MS	No
6	334	43	30 (4.9)	4.0	Trauma	Yes
3	1041	160	78 (12.8)	3.6	MS	Yes
11	95	10	6 (1.0)	2.9	Surgical	No
7	749	87	60 (9.9)	2.1	MS	Yes
9	185	26	8 (1.1)	1.1	MS	No
1	287	41	10 (1.6)	0.8	MS	No
10	281	146	3 (0.5)	0.5	MS	No
14	227	43	4 (0.7)	0.5	MS	Yes
18	260	56	3 (0.5)	0.4	MS	No

Total 5096 924 564 (91.9)

*Reported Cases from Public Hospitals

** MS – Medical-Surgical

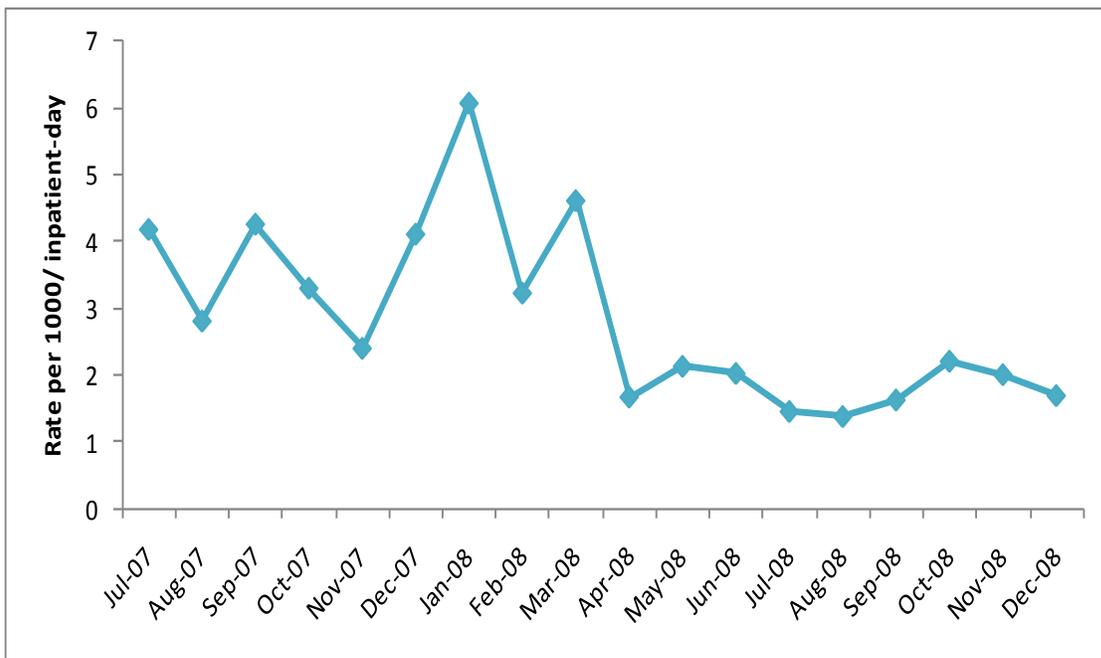


Figure 1. Distribution by month of cases of Ab MDR

10.6. Artigo 3 em Português

Submetido ao Infection Control Hospital Epidemiology em 01 de março, 2010

Níveis Endêmicos Elevados de *Acinetobacter baumannii* Multirresistente entre hospitais no Sul do Brasil

Autores: Andreza F. Martins, Ms¹; Ricardo S. Kuchenbecker, MD, PhD² Andrea Gomes, PhD³; Anelise Breier, Ms³; Afonso L. Barth, PhD⁴; e Grupo de Trabalho CMCIES Força Tarefa⁵

1.e 3. Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde, Porto Alegre, Brasil

2. Serviço de Controle de Infecção, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

4. Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

5.CMCIES-PMPA/SMS – Comissão Municipal de Controle de Infecção em Estabelecimentos de Saúde – Prefeitura Municipal de Porto Alegre/ Secretaria

Municipal de Saúde : Andreza Francisco Martins Anelise Breier and Mariza Ochoa Favarini (Department Of Surveillance Health); Beatriz Azambuja Baptista (Grupo

Hospitalar Conceição); Carla Maria Oppermann (Hospital De Pronto Socorro);Cassiana Gil Prates (Hospital Ernesto Dornelles); Lahir Chaves Dias

(Grupo Hospitalar Conceição); Juliana Gil Prates (Hospital Mãe De Deus); Nádía

Kuplich (Hospital De Clínicas De Porto Alegre); Ricardo S. Kuchenbecker (Hospital

De Clínicas De Porto Alegre); Teresa C. Sukiennik (Complexo Hospitalar Santa Casa De Porto Alegre)

Corresponding author: Andreza Francisco Martins, . Department of Surveillance Health, Porto Alegre, Brazil. 372 Padre Cacique Avenue, 3floor

90810240- Porto Alegre/RS, Brazil. andrezafm@sms.prefpoa.com.br

Resumo

A maioria dos dados publicados sobre *Acinetobacter baumannii* multirresistente (MDR *A. baumannii*) são originados de surtos. Nós relatamos a tendência de prevalência de infecções Associadas aos cuidados de Saúde causadas por MDR *A. baumannii* durante 18 meses na cidade de Porto Alegre, sul do Brasil. As maiores taxas de infecção por MDR *A. baumannii* foram encontradas nas UTIs.

Introdução

Até onde sabemos, a maioria dos estudos relatando dados sobre infecções relacionadas aos cuidados de saúde (HAI) causadas por MDR *A. baumannii* se origina de surtos [1]. Somente poucos estudos estimaram as taxas endêmicas de MDR *A. baumannii* em hospitais, fora do período de surto [2, 3]. Essa informação é relevante para estimar níveis endêmicos e epidêmicos e para fornecer evidências adicionais relacionadas ao impacto das medidas implantadas para erradicar ou reduzir cepas MDR *A. baumannii*. Neste contexto de um surto envolvendo alguns hospitais, taxas de prevalência de MDR *A. baumannii* foram determinadas para descrever a tendência de diferentes instituições.

No Brasil, MDR *A. baumannii* tem emergido como um patógeno nosocomial desde 1993, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), resultando em um patógeno endêmico [4], e agora é reconhecido como uma importante causa de morbidade. Estes patógenos oportunistas são responsáveis por pneumonia associada a ventilação mecânica, bacteremia, infecções de feridas cirúrgicas e do trato urinário, entre outras [1].

Porto Alegre é uma cidade com 1,4 milhões de habitantes e 7223 leitos hospitalares incluindo hospitais públicos e privados [5]. O primeiro caso de MDR *A. baumannii* foi relatado em 2004 em um grande hospital clínico-cirúrgico. No início de 2007, alguns hospitais relataram casos de MDR *A. baumannii* e quatro UTIs foram fechadas devido a surtos de MDR *A. baumannii* nos 18 meses seguintes.

Neste período, 18 hospitais relataram casos de MDR *A. baumannii*, e em parte dos hospitais afetados na cidade a disseminação cruzada de um mesmo clone foi documentada. Departamento de Saúde Local estabeleceu uma força tarefa para monitorar os casos de HAI por MDR *A. baumannii* através de um sistema de notificação obrigatória.

Métodos

Nós avaliamos todos os dados consecutivamente relatados de casos de HAI por MDR *A. baumannii* notificados ao sistema de informação da cidade, de julho de 2007 a dezembro de 2008.

O Sistema de Notificação do Departamento de Saúde local obteve informações demográficas, clínicas e de desfecho das HAI relacionadas à MDR *A. baumannii*. Os casos incluídos no estudo foram de infecção que ocorreram mais de 48 horas após a admissão do paciente, de acordo com os critérios do CDC [6]. Para evitar duplicação de notificações repetidas de um mesmo paciente, somente a primeira notificação de cada um foi considerada. As taxas de prevalência de HAI MDR *A. baumannii* de cada hospital foram obtidas dividindo o número de casos notificados pelo número de pacientes-dia de cada instituição. O sistema de vigilância da cidade foi criado como uma das várias medidas de intervenção promovidas em conjunto pelos hospitais afetados sobre a coordenação do Departamento de Saúde local. Estas iniciativas incluíram a revisão dos casos de infecção e políticas voltadas para a erradicação/redução dos casos de MDR *A. baumannii*.

A identificação de MDR *A. baumannii* foi realizada através de sistema automatizado e/ou métodos fenotípicos padronizados. Para fins deste estudo considerou-se *A. baumannii* como todas as espécies pertencentes ao complexo *A. baumannii-calcoaceticus* e MDR *A. baumannii* foram todos os isolados resistentes a mais de três classes de antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos [1].

Isolados de cinco hospitais que foram confirmados como MDR *A. baumannii* através de métodos moleculares, foram genotipados por *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) usando *Apal* como endonuclease de restrição e REP-PCR [1,7].

Resultados

Seiscentos e nove casos de MDR *A. baumannii* HAI foram relatados de pacientes atendidos em 18 hospitais durante o período do estudo. A maioria dos pacientes (66,5%) tinha entre 51-99 anos, 61,8% eram homens e 54,9% eram pacientes cirúrgicos quando HAI MDR *A. baumannii* foi diagnosticada. A maioria dos pacientes usou cateter venoso central e sonda vesical, 85,2% e 85,3% respectivamente, a maioria dos pacientes foi submetido a ventilação mecânica (72,4%) e tiveram pneumonia associada a ventilação mecânica (77,3%). O uso prévio de antimicrobianos nos últimos 90 dias foi documentado em 95,4% dos casos de HAI MDR *A. baumannii*.

Todos os hospitais documentaram casos de infecção nas UTIs. Uma diferença substancial nas taxas de HAI MDR *A. baumannii* foi observada entre os hospitais (Tabela 1), variando de 0,4 a 9,0 casos por 1000 pacientes-dia, respectivamente a menor e a maior taxa de prevalência entre os hospitais. Esta informação foi obtida somente para os hospitais públicos que representaram 91,9% (564) dos casos (Tabela 1). Observa-se que mais de um terço do total de casos no período do estudo ocorreu em um único hospital clínico-cirúrgico. Hospitais de trauma contabilizaram duas das quatro taxas mais elevadas entre os hospitais do estudo, com taxas de HAI MDR *A. baumannii* de 9,0 e 4,0.

Nós detectamos a disseminação clonal de MDR *A. baumannii* entre cinco hospitais. Além disso, co-circulação de diferentes clones foi também identificada

(dados não mostrados). Interessantemente, dois dos menores hospitais (144 e 95 leitos) neste estudo, lideraram o ranking com altas taxas de MDR *A. baumannii*.

As taxas de HAI MDR *A. baumannii* em todos os hospitais demonstraram um padrão de distribuição de duas fases no período do estudo (Figura 1). De julho de 2007 a abril de 2008, taxas elevadas de HAI MDR *A. baumannii* foram observadas, com aumento substancial durante os meses de verão (dezembro de 2007 a março de 2008). Após este período, em todos os hospitais as taxas foram reduzidas ao redor de 50% de abril a dezembro de 2008, caracterizando uma distribuição sazonal [4].

Foi observada uma redução substancial nas taxas de HAI MDR *A. baumannii* após o desenvolvimento de intervenções nos hospitais afetados apesar da grande variação das taxas de HAI MDR *A. baumannii* entre os hospitais (Tabela 1).

Discussão

Este é o primeiro relato documentando a tendência de taxas de prevalência de HAI MDR *A. baumannii* dentro de hospitais públicos envolvidos em um surto por toda a cidade. Morgan e colaboradores relataram taxas de infecção por CRAB durante após 10 anos de estudos, mas somente em UTI's [8].

Comparado a outros estudos, nossas taxas de HAI MDR *A. baumannii* são maiores [8, 9]. A impressionante variação de taxas de HAI MDR *A. baumannii* entre os hospitais públicos enfatiza a importância de esforços coordenados (múltiplos hospitais) para reduzir a contaminação cruzada dentro das instituições

afetadas. A observação de pequenos hospitais com elevadas taxas de HAI MDR *A. baumannii* pode representar surtos altamente concentrados que poderiam ser explicados pelas características destes hospitais, pela severidade dos pacientes e pelas medidas de prevenção e controle de infecções.

A maior parte dos casos documentados ocorreu em pacientes com comorbidades, doenças graves e submetidos a procedimentos invasivos nas UTIs, deste modo representando um fardo para os hospitais sobrecarregados com pacientes crônicos [1, 10], especialmente em locais com recursos limitados.

Como o número de casos foi originado de notificação dos hospitais, estas taxas podem ser propensas a subnotificação de HAI MDR *A. baumannii* diagnosticadas.

A variação sazonal observada em HAI devido a MDR *A. baumannii* pode ser relacionada ao aumento da umidade do ambiente e ao clima quente que são favoráveis para o crescimento de *A. baumannii* [4], e deste modo enfatizando a importância de estratégias de vigilância local para estabelecer a melhor medida para controlar o surto e reduzir os níveis endêmicos. Realmente é importante conhecer os níveis endêmicos de MDR *A. baumannii*, não somente para prevenir novos casos, mas também para entender e prever padrões de disseminação de bactérias multirresistentes [1,8].

Estudos adicionais de prevalência não-epidêmica são necessários para promover um conhecimento melhor sobre os padrões de disseminação de MDR *A.*

baumannii dentro dos hospitais e a contaminação cruzada entre os hospitais afetados.

References

1. Peleg AY, Seifert H, and Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(3): 538-82.
2. Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lai H, Quale J. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis* 2000; 31(1): 101-6.
3. Quale J, Bratu S, Landman D, Heddurshetti R. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin Infect Dis* 2003; 37(2): 214-20.
4. Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin Infect Dis* 2001; 32 Suppl 2: S104-13.
5. Available at: http://www.cnes.datasus.gov.br/Mod_Ind_Tipo_Leito.asp?VEstado=43 &VMun=431490 in 1st december, 2009.

6. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988; 16(3): 128-40.
7. Oteo J, Garcia-Estebanez C, Miguelanez S, et al. Genotypic diversity of imipenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Spain. *J Infect* 2007; 55(3): 260-6
8. Morgan DJ, Weisenberg SA, Augenbraun MH, et al. Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in New York City 10 years into the Epidemic. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30(2): 196-97.
9. van den Broek PJ, van der Reijden TJ, van Strijen E, Helmig-Schurter AV, Bernards AT, Dijkshoorn L. Endemic and epidemic acinetobacter species in a university hospital: an 8-year survey. *J Clin Microbiol* 2009; 47(11): 3593-9.
10. Murray CK and Hospenthal DR. *Acinetobacter* infection in the ICU. *Crit Care Clin* 2008; 24(2): 237-48.

Tabela 1. Dados dos Isolados de *Acinetobacter baumannii* MDR

Hospital	Leitos	Leitos de UTI	Casos relatados (%)	Taxa de Infecção /1000 pacientes-dia	Perfil do Hospital	Disseminação Clonal
----------	--------	---------------	---------------------	--------------------------------------	--------------------	---------------------

8	144	48	74 (12,1)	9,0	Trauma	Não
5	840	156	211 (34,7)	5,5	Clínico- Cirúrgico	Sim
2	603	108	77 (12,6)	5,1	Clínico- Cirúrgico	Não
6	334	43	30 (4,9)	4,0	Trauma	Sim
3	1041	160	78 (12,8)	3,6	Clínico- Cirúrgico	Sim
11	95	10	6 (1,0)	2,9	Cirúrgico	Não
7	749	87	60 (9,9)	2,1	Clínico- Cirúrgico	Sim
9	185	26	8 (1,1)	1,1	Clínico- Cirúrgico	Não
1	287	41	10 (1,6)	0,8	Clínico- Cirúrgico	Não
10	281	146	3 (0,5)	0,5	Clínico- Cirúrgico	Não
14	227	43	4 (0,7)	0,5	Clínico- Cirúrgico	Sim
18	260	56	3 (0,5)	0,4	Clínico- Cirúrgico	Não
Total	5096	924	564 (91,9)			

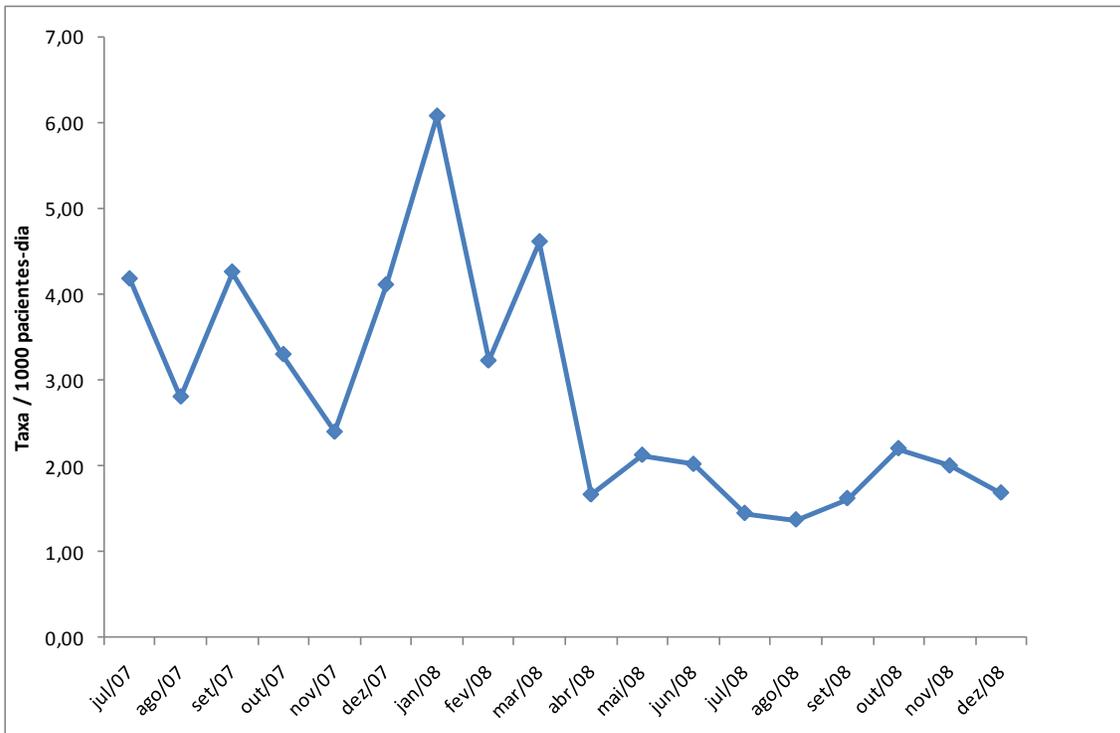


Fig. 1 Distribuição mensal dos casos de *A. baumannii* MDR.

10.7. Artigo 4 em Inglês

To be submitted to Brazilian Journal of Microbiology (note)

Prevalence of β -lactamases OXA-type in isolates of *Acinetobacter* sp. carbapenem-resistant in Porto Alegre, Brazil

Andreza F. Martins^{1*}, Viviane G. Obach³, Mariana C. Falkembach³, Mariana Pagano³, Libera Maria Dalla-Costa⁵, Afonso L. Barth⁴

¹Department of Health Surveillance, Porto Alegre, Brazil; ² Infectious Diseases Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos Street, 90035-903, Porto Alegre, Brazil; ³Centro Universitário IPA Metodista, Porto Alegre, Brazil; ⁴Medical Sciences Post-Graduate Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ⁵Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), Curitiba, Brazil.

*Andreza F. Martins - Corresponding Autor: Coordenadoria de Vigilância em Saúde de Porto Alegre, 372/3 Padre Cacique Avenue, Porto Alegre, RS, 90000-000, Brazil; Fax: (+55/51) 32892425, e-mail: andreza_20@pop.com.br

Keywords: oxacillinases, metallo- β -lactamases, *Acinetobacter* sp.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the presence of metallo- β -lactamases (MBL) and oxacillinases (OXA) in *Acinetobacter baumannii* (CRAb). We available 584 isolates from 7 hospitals of Porto Alegre and a total of 95% of these were positive for *bla*_{OXA-23}. The high prevalence of *bla*_{OXA-23} indicates that this is the main carbapenemase in CRAb.

Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAb) has emerged as a major nosocomial pathogen worldwide (1). Carbapenemases production, either metallo- β -lactamases (MBLs) or oxacilinases (OXA), is the main resistance mechanism responsible for resistance to carbapenems (1). In Porto Alegre, southern Brazil, we have recently described the presence of OXA-23-producing *A. baumannii* (2).

In this study we analyzed 584 carbapenem-resistant *Acinetobacter* sp. isolates of colonization/infection from seven hospitals in our city from July 2007 to July 2008. Isolates were identified using the API 20NE system (Biomerieux, Basingstoke, United Kingdom) or Vitek 2 (Biomerieux, Basingstoke, United Kingdom). The MIC for imipenem was performed by Etest (AB BIODISK, solna, Sweden) or Vitek 2 (Biomerieux, Basingstoke, United Kingdom).

To determine the prevalence of the MBL, the screening test for MBLs either by the disk-approximation test using a ceftazidime (CAZ) and a 2-mercaptopropionic acid (MPA) or by the Etest MBL (Imipenem/Imipenem + EDTA - AB BIODISK, Solna, Sweden) were performed (3, 4). To confirmed positive results in screening test for MBL, we performed PCR using *bla*_{IMP-1-like}, *bla*_{VIM-2-like} and *bla*_{SPM-1} primers. To determine the prevalence of the OXA, a multiplex PCR, which included primers for the *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} genes, performed according to Woodford et al (5).

The *bla*_{OXA-51} gene has been used as a specie marker of *A. baumannii* as this gene is considered intrinsic to this specie (6). In fact, the phenotypic tests are

unable to fully separate the species of the *A. baumannii-calcoaceticus* complex, and therefore, it is necessary to use a molecular marker to this end such as the identification of *bla*_{OXA-51} gene. From the 584 CRAB isolates, only 12 (2.1%) were negative to *bla*_{OXA-51} gene by multiplex PCR. This result agrees with studies that showed the high prevalence of *A. baumannii* among Multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* sp (1, 8). In fact, recent report by Lee et al., identified *bla*_{OXA-51} gene in *Acinetobacter* genomic species 13TU and the surrounding genetic elements suggested that its origin was from *A. baumannii* (7). However, this species is very little prevalent in clinical isolates (1, 8).

All isolates presented MIC \geq 8 μ g/mL and a total of 553 (95%) isolates proved to be OXA-23 producers by PCR. Among the 553 OXA-23-like CRAB producing isolates, we observed that 86 (15.5%) isolates were positive in screening tests for MBL. Therefore, PCR failed to produce any amplicon in isolates that were positive in screening test for MBL. While for MBLs there are screening test for their detection (3), which are considered high sensitive and specific, the same is not true for OXA.

In 5% isolates, the resistance mechanism was not determined because all primers used (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{IMP-1-like}, *bla*_{VIM-2-like} and *bla*_{SPM-1}) failed to produce any amplicon.

OXA enzymes can be formed by dimers (9). As divalent metals are needed to make the dimeric structure more stable, a chelator agent would affect the activity of such enzymes. It has already been demonstrated that the activity of OXA-10 and

OXA-14 against nitrocefin was increased in the presence of divalent cations (9). Therefore, chelators, such as EDTA or MPA, may inhibit these OXA enzymes producing a result that could be interpreted as positive for the presence of MBL according to the phenotypic methods (9). However, there is no information about the crystalline structure of the OXA-23 enzyme to confirm this theory. In addition, EDTA has an inhibitory effect against some bacteria due to the permeability of the outer membrane which can also lead to false-positive results in screening to MBL.

The major limitation of our study is that we did not performed PCR for all MBLs described in *A. baumannii-calcoaceticus* complex, although other variants (SIM-1 and AIM-1) are very little prevalent and have never been identified in isolates of *Acinetobacter* spp. outside the origin countries. Also, we believe that it is unlikely that these 86 OXA-23-producing isolates also harbored a MBL gene, since the only report in the literature refers to identification of IMP-4 and OXA-58 in isolates from Singapore (10).

The *bla*_{OXA-23} gene is the high prevalent oxacillinase among CRAB in our city. Although positive results have been obtained by phenotypic screening tests for MBL the PCR was negative for these genes. So, it is necessary to be careful to interpret the positive results in phenotypic screening tests for MBL in CRAB because false-positive results may occur.

Funding

This study has received financial support from the Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Transparency declarations

ALB are research fellows from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil. All other authors: none to declare.

References

1. Peleg, A.; Seifert, H. and Paterson, D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Review.* 21(3): 538-82.
2. Martins, A.F.; Kuchenbecher, R.; Sukiennik, T.; et al. (2009). Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme: Dissemination in Southern Brazil. *Infect.* 37: 474-76
3. Arakawa, Y.; Shibata, N.; Shibayama, K.; et al. (2000). Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. *J. Clin. Microbiol.* 38: 40–3.
4. Walsh, T.R.; Bolmström, A.; Qwörnström, A. and Gales, A.C. (2002). Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo- β -Lactamases in Routine Clinical Testing. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2755-59.
5. Woodford, N.; Ellington, M.; Coelho, J.; et al. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agent.* 27: 351-53.

6. Turton, J.F.; et al. (2006). Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44(8): 2974-6.
7. Lee, Y.T., et al.; (2009). First identification of blaOXA-51-like in non-baumannii *Acinetobacter* spp. *J. Chemother.* 21(5): 514-20.
8. van den Broek, P.J.; et al. (2009). Endemic and epidemic acinetobacter species in a university hospital: an 8-year survey. *J. Clin. Microbiol.* 47(11): 3593-9.
9. Danel, F.; Frère, J.M. and Livermore D.M. (2001). Evidence of dimerization among class D b-lactamases: Kinetics of OXA-14 b-lactamase. *Bioch and Biophysic Acta.*1546: 132-42.
10. Koh, T.H.; Sng, L.H.; Wang, G.C.Y.; Hsu, L.Y.; Zhao, Y. (2008). IMP-4 and OXA b-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother.* 59: 627-32.

Table 1. Prevalence of MBL and OXA in isolates of *Acinetobacter* sp.

Hospital	Nº of Isolates (%)	OXA-23* (%)	OXA-51* (%)	MBL screening* (%)	PCR MBL**
1	73	71	73	2	none
2	302	301	301	44	none
3	81	75	81	11	none
4	57	56	57	13	none
5	48	32	45	14	none
6	10	8	10	1	none
7	13	10	13	1	none
Total	584 (100.0%)	553 (95.0%)	572 (97.9%)	86 (14.7%)	none

*Number of isolates positive

** PCR to performed to *bla*_{IMP-1-like}, *bla*_{VIM-2-like} and *bla*_{SPM-1}

10.8. Artigo 4 em Português

Para ser submetido ao Brazilian Journal of Microbiology (nota prévia)

Prevalência de β -lactamases do tipo OXA em isolados de *Acinetobacter* sp. resistentes aos carbapenêmicos em Porto Alegre, Brasil

Andreza F. Martins^{1*}, Viviane G. Obach², Mariana C. Falkembach², Mariana Pagano², Libera Maria Dalla-Costa³, Afonso L. Barth⁴

¹Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde, Porto Alegre, Brasil; ²Centro Universitário IPA Metodista, Porto Alegre, Brasil; ³Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), Curitiba, Brasil; ⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

*Andreza F. Martins – Autor Correspondente: Coordenadoria de Vigilância em Saúde de Porto Alegre, Av. Padre Cacique, 372/3- Porto Alegre, RS, 90000-000, Brasil; Fax: (+55/51) 32892425, e-mail: andreza_20@pop.com.br

Palavras-chaves: oxacilinases, metalo- β -lactamases e *Acinetobacter* sp.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de metalo- β -lactamases (MBL) e oxacilinases (OXA) em *Acinetobacter baumannii* (CRAb). Nós avaliamos 584 isolados de 7 hospitais da cidade de Porto Alegre e um total de 95% destes foi positivo para *bla*_{OXA-23}. A alta prevalência de *bla*_{OXA-23} indica que esta é a principal carbapenemase em CRAb.

A. baumannii resistente aos carbapenêmicos (CRAb), têm emergido como um dos patógenos nosocomiais mais importantes no mundo (1). A produção de carbapenemases, metalo- β -lactamases (MBL) ou oxacilinasas (OXA), é o principal mecanismo de resistência responsável pela resistência aos carbapenêmicos (1). Em Porto Alegre, sul do Brasil, nós recentemente temos descrevemos a presença de *A. baumannii* produtor de OXA-23 (2).

Neste estudo nós analisamos 584 isolados de *Acinetobacter* sp. resistente aos carbapenêmicos, isolados de pacientes colonizados ou infectados, provenientes de sete hospitais da nossa cidade ente julho de 2007 e julho de 2008. Isolados foram identificados pelo sistema API 20 NE (Biomérieux, Basingstoke, United Kingdom) ou Vitek 2 (Biomérieux, Basingstoke, United Kingdom). A CIM para o imipenem foi determinada por Etest[®] (AB BIODISK, Solna, Sweden), MICE[®] (Oxoid) ou Vitek 2 (Biomérieux, Basingstoke, United Kingdom)

Para determinar a prevalence de MBL, teste de triagem para MBLs por aproximação de disco usando ceftazidima (CAZ) e ácido 2-mercaptopropiônico (MPA) ou por Etest MBL (imipenem/ imipenem+EDTA) foram realizados (3, 4). Para confirmar resultados positivos do teste de triagem para MBL, nós realizamos PCR usando os *primers* *bla*_{IMP-1-like}, *bla*_{VIM-2-like} and *bla*_{SPM-1}. Para determinar a prevalência de OXA, um multiplex PCR, que incluiu os *primers* para os genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} foi realizado de acordo com Woodford et al. (5).

O gene *bla*_{OXA-51} tem sido usado como marcador de espécie de *A. baumannii* pois é considerado intrínseco a esta espécie (6) . É fato que os

testes fenotípicos são incapazes de separar totalmente as espécies do complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, e portanto, é necessário o uso de um marcador molecular para este fim tal como a identificação do gene *bla*_{OXA-51}. Dos 584 isolados de CRAb, apenas 12 (2,1%) foram negativos para o gene *bla*_{OXA-51} por multiplex PCR. Este resultado concorda com os estudos que mostram a elevada prevalência de *A. baumannii* entre isolados clínicos multirresistentes de *Acinetobacter* sp. (1, 8). Cabe mencionar que recente estudo publicado por Lee et al., identificou o gene *bla*_{OXA-51} em isolados de *Acinetobacter* genoespécie 13TU cujo contexto genético sugere que sua origem foi de *A. baumannii* (7). Entretanto essa espécie é muito pouco prevalente entre isolados clínicos (1, 8).

Todos os isolados apresentaram CIM $\geq 8\mu\text{g/mL}$ e um total de 553 (95%) isolados foi positivo para o gene *bla*_{OXA-23} por PCR. Entre os 553 isolados de CRAb OXA-23-like positivos, nós observamos que 86 (15,5%) foram positivos no teste de triagem para MBL. Entretanto, PCR falhou em produzir algum produto nos isolados que foram positivos no teste de triagem para MBL. Enquanto para MBLs existem testes de triagem para sua detecção (3) que são considerados sensíveis e específicos, o mesmo não é verdade para OXA. Em 5% dos isolados, o mecanismo de resistência não foi determinado, pois não houve produto de amplificação com nenhum dos *primers* utilizados (*bla*_{IMP-1-like}, *bla*_{VIM-2-like}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}).

As enzimas do tipo OXA podem ser formadas por dímeros (9). Como os metais divalentes são necessários para manter estável a estrutura dimérica, um agente quelante poderia afetar a atividade destas enzimas. Tem sido

demonstrado que a atividade de OXA-10 e OXA-14 contra nitrocefim aumentou na presença de cátions divalentes (9). Portanto, quelantes como EDTA ou MPA podem inibir enzimas do tipo OXA produzindo um resultado que poderia ser interpretado como positivo nos testes fenotípicos de triagem para MBL (9). Entretanto, não existe informação na literatura sobre a estrutura cristalina de OXA-23 para confirmar esta teoria. Além disso, EDTA tem um efeito inibidor importante contra algumas bactérias devido à permeabilidade da membrana externa que pode também levar a resultados falsos positivos nos testes de MBL.

A maior limitação deste estudo é que não realizamos PCR para todas as MBLs já descritas no complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, embora outras variantes (SIM-1 and AIM-1) sejam muito pouco prevalentes e não tenham sido identificadas em isolados de *Acinetobacter* sp. fora dos países de origem (1). Nós também acreditamos que é pouco provável que estes 86 isolados OXA-23 positivos carreguem também um gene de MBL já que somente um relato na literatura refere a identificação de IMP-4 e OXA-58 em isolados de Singapura (10).

O gene *bla*_{OXA-23} é muito prevalente entre isolados de CRAb em nossa cidade. Embora resultados positivos tenham sido obtidos através de testes de triagem para MBL a técnica de PCR foi negativa para os genes pesquisados. Assim, é necessário ser cuidadoso ao interpretar resultados positivos em testes de triagem para MBL em CRAb pois resultados falso positivos podem ocorrer.

Financiamento

Este estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pelo Centro Nacional para o Desenvolvimento da Ciência e Tecnologia (CNPq).

Conflito de Interesse

ALB é pesquisador do Centro Nacional para o Desenvolvimento da Ciência e Tecnologia (CNPq), Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasil. Os demais autores: nada a declarar

Referências

1. Peleg, A.; Seifert, H. and Paterson, D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Review.* 21(3): 538-82.
2. Martins, A.F.; Kuchenbecher, R.; Sukiennik, T.; et al. (2009). Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme: Dissemination in Southern Brazil. *Infect.* 37: 474-76
3. Arakawa, Y.; Shibata, N.; Shibayama, K.; et al. (2000). Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. *J. Clin. Microbiol.* 38: 40–3.
4. Walsh, T.R.; Bolmström, A.; Qwörnström, A. and Gales, A.C. (2002). Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo- β -Lactamases in Routine Clinical Testing. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2755-59.

5. Woodford, N.; Ellington, M.; Coelho, J.; et al. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agent.* 27: 351-53.
6. Turton, J.F.; et al. (2006). Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44(8): 2974-6.
7. Lee, Y.T., et al.; (2009). First identification of blaOXA-51-like in non-baumannii *Acinetobacter* spp. *J. Chemother.* 21(5): 514-20.
8. van den Broek, P.J.; et al. (2009). Endemic and epidemic acinetobacter species in a university hospital: an 8-year survey. *J. Clin. Microbiol.* 47(11): 3593-9.
9. Danel, F.; Frère, J.M. and Livermore D.M. (2001). Evidence of dimerization among class D b-lactamases: Kinetics of OXA-14 b-lactamase. *Bioch and Biophysic Acta.*1546: 132-42.
10. Koh, T.H.; Sng, L.H.; Wang, G.C.Y.; Hsu, L.Y.; Zhao, Y. (2008). IMP-4 and OXA b-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother.* 59: 627-32.

Tabela 1. Prevalência de MBL e OXA em isolados de *Acinetobacter* sp.

Hospital	Nº de Isolados (%)	OXA-23* (%)	OXA-51* (%)	Triagem MBL * (%)	PCR MBL**
1	73	71	73	2	Neg
2	302	301	301	44	Neg
3	81	75	81	11	Neg
4	57	56	57	13	Neg
5	48	32	45	14	Neg
6	10	8	10	1	Neg
7	13	10	13	1	Neg
Total	584 (100.0%)	553 (95.0%)	572 (97.9%)	86 (14.7%)	-

*Número de isolados positivos

** PCR foi realizada para pesquisa de *bla*_{IMP-1-like}, *bla*_{VIM-2-like} and *bla*_{SPM-1}

Neg = Resultado negativo

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho constatou-se que no período do estudo:

- ✓ Os pacientes mais afetados por infecções causadas por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos foram homens com mais de 50 anos, submetidos a múltiplos procedimentos invasivos, principalmente ventilação mecânica;
- ✓ Houve uma grande diferença entre as taxas de infecção informadas pelos hospitais que pode estar associada às características do hospital ou a uma subnotificação de casos;
- ✓ Comparado com dados encontrados na literatura, nossas taxas de infecção por CRAb são mais elevadas do que em outras cidades e países;
- ✓ Mais de 90% dos isolados de CRAb apresentaram a enzima OXA-23-like em seu genoma;
- ✓ Nenhum isolado apresentou as enzimas OXA-24-like e OXA-58-like em seu genoma com os *primers* usados;
- ✓ Os testes fenotípicos para MBL em *Acinetobacter baumannii* devem ser interpretados com cuidado, pois nenhum isolado apresentou IMP-1, VIM-2 ou SPM-1 em seu genoma através da técnica de PCR, apesar de 20% dos isolados pesquisados terem apresentado teste fenotípico positivo para MBL;
- ✓ Houve disseminação de um mesmo clone presente em amostras coletadas no ambiente hospitalar e em pacientes infectados;
- ✓ Houve disseminação interinstitucional de 3 diferentes clones de CRAb evidenciada pelos métodos de tipagem molecular;
- ✓ A co-circulação de clones esporádicos com clones epidêmicos foi constatada pelos métodos de tipagem molecular;
- ✓ Mais estudos são necessários a fim de compreender melhor as características dos clones epidêmicos de modo a prevenir e/ou reduzir a disseminação e o impacto destes sobre os pacientes.