

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Avaliação de método de identificação molecular e distribuição das espécies do complexo  
*Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* em dois hospitais de Porto Alegre

Aline Borges Teixeira

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Aline Borges Teixeira

Avaliação de método de identificação molecular e distribuição das espécies do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* em dois hospitais de Porto Alegre

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção de título de Mestre

Orientador: Afonso Luis Barth

Porto Alegre

2013

# DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

Borges Teixeira, Aline

Avaliação de método de identificação molecular e distribuição das espécies do complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* em dois hospitais de Porto Alegre / Aline Borges Teixeira. -- 2013.

55 f.

Orientador: Afonso Luis Barth.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*. 2. Identificação de espécies. 3. Multiplex PCR. 4. Resistência. I. Luis Barth, Afonso, orient. II. Título.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta conquista aos meus pais, à minha irmã,  
ao meu grande amor e aos meus mestres.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu querido Orientador, na vida profissional e acadêmica, Afonso Luis Barth pelas oportunidades e aprendizado que me proporcionou e por quem tenho imensa gratidão por sua confiança no início e durante este trabalho acadêmico.

À minha grande mestre Andreza Francisco Martins quem agradeço pela oportunidade de ser sua aluna, pela amizade, pelos conhecimentos divididos e que me espelho como profissional e professora.

Às alunas de iniciação científica Carolina Nodari, Juliana Ayres e Caroline Pormann pelo auxílio nas atividades práticas e experimentos relacionados à este trabalho.

Aos colegas do Centro de Pesquisa Experimental: Everaldo, Jeferson, e Patricia pelo auxílio na base de execução das atividades laboratoriais.

Às colegas do grupo de pesquisa do Prof. Afonso e Prof Alexandre que compartilharam experiências, transmitiram conhecimento, auxiliaram e incentivaram este trabalho.

Às colegas do Laboratório de Doenças Auto-Imunes e Infecciosas que compartilharam momentos durante a realização deste trabalho.

Ao meu pai Osvaldo e minha mãe Eliana por acreditarem e incentivarem os meus sonhos e objetivos.

À minha grande amiga e irmã Lílian, pelos momentos de apoio incentivo durante estes dois anos.

Ao meu amor Bruno pelo amor, auxílio e companheirismo fundamentais para esta conquista.

" Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança."

(Albert Einstein)

## RESUMO

**Introdução:** O gênero *Acinetobacter* sp apresenta considerável heterogeneidade possuindo inúmeras espécies. Atualmente, 23 espécies já foram nomeadas e nove outras espécies já foram descritas. Quatro destas espécies possuem contextos clínicos e epidemiológicos diferentes, no entanto são agrupadas em um complexo denominado *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (ABC) devido à sua similaridade genética e fenotípica. Diversos testes para diferenciação do complexo já foram descritos, porém a maioria não pode ser realizado na rotina laboratorial, pois são caros e laboriosos. **Objetivos:** Avaliar um método rápido e viável na rotina laboratorial, capaz de diferenciar as espécies do complexo ABC; Determinar a prevalência das diferentes espécies do complexo ABC; Avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nas diferentes espécies. **Métodos:** Foram analisadas 118 amostras de dois hospitais de Porto Alegre-RS através do método Multiplex PCR para o gene *gyrB* e posteriormente confirmadas pelo padrão-ouro: sequenciamento do 16S-23S ITS. O perfil de suscetibilidade foi realizado através de microdiluição em caldo. **Resultados:** Das 118 amostras identificadas inicialmente como *Acinetobacter* sp., a grande maioria dos isolados (106 -89.9%) foram identificados como *A. baumannii*; mas doze isolados foram identificados como sendo das demais espécies do complexo ABC: 6 (5.1%) *A. nosocomialis*, 5 (4.2%) *A. pittii*, e 1 (0.8%) *A. genoespécie 10*, através da técnica de Multiplex PCR. Todos os resultados foram confirmados por sequenciamento. *A. baumannii* apresentou um elevado nível (72,6%) de resistência ao imipenem em comparação com as outras espécies seguido da espécie *A. nosocomialis* que apresentou metade de seus isolados resistentes. Todas as espécies apresentaram baixos índices (inferior a 7,5%) de resistência à Polimixina B e Tigeciclina. **Conclusão:** O Multiplex PCR para o gene *gyrB* apresentou resultados fidedignos quando comparados ao padrão-ouro, demonstrando, assim, ser um método confiável para a identificação das espécies do complexo ABC. Outras espécies, além de *A. baumannii*, ABC podem apresentar percentuais significativos de resistência ao imipenem.

**PALAVRAS-CHAVE:** Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*, multiplex PCR, identificação de espécies, resistência.

## ABSTRACT

**Background:** Introduction: The genus *Acinetobacter* sp presents considerable heterogeneity possessing numerous species. Currently, 23 species have been named and nine other species have been described. Four of these species have different clinical and epidemiological contexts, but are grouped in a complex called *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (ABC) due to their genetic and phenotypic similarity. Several tests for differentiation of the complex have been described, but most can not be performed routinely in the laboratory, they are expensive and laborious. **Objectives:** To evaluate a fast and feasible in routine laboratory able to differentiate the species of the complex ABC; determine the prevalence of different species of the complex ABC; evaluate the antimicrobial susceptibility profile of the different species. **Methods:** We analyzed 118 samples from two hospitals in Porto Alegre-RS by the method of Multiplex PCR for gene *gyrB* and subsequently confirmed by the gold standard: sequencing the 16S-23S ITS. The susceptibility profile was performed by microdilution. **Results:** Of the 118 samples initially identified as *Acinetobacter* sp. The great majority of isolates (106 -89.9%) were identified as *A. baumannii*, but twelve isolates were identified as being from other species of the complex ABC: 6 (5.1%) *A. nosocomialis*, 5 (4.2%) *A. pittii*, and 1 (0.8%) *A. genospecie* 10 by Multiplex PCR technique. All results were confirmed by sequencing. *A. baumannii* showed a high level (72.6%) of imipenem resistance in comparison with the other species followed by the species *A. nosocomialis* showed that half of his resistant isolates. All species showed low levels (less than 7.5%) of resistance to Polymyxin B and Tigecycline. **Conclusion:** Multiplex PCR for gene *gyrB* results presented totally reliable when compared to the gold standard, demonstrating thus be a safe method for the laboratory. Other species besides *A. baumannii*, ABC may have significant percentages of resistance to imipenem.

**KEYWORDS:** *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex, multiplex PCR, species identification, resistance.



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de anelamento dos primers Multiplex PCR <i>gyrB</i> .....	24
<b>Tabela 1.</b> Descrição das espécies do gênero <i>Acinetobacter sp</i> .....	17
<b>Tabela 2.</b> Caracterização bioquímica das espécies do complexo ABC.....	21
<b>Tabela 3.</b> Tabela de <i>primers</i> e tamanho de fragmentos obtidos pelo PCR.....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS

### SIGLA - SIGNIFICADO

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AP-PCR – *Arbitrary Primer based Polymerase Chain Reaction*

Complexo ABC - *Complexo Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*

ITS - *Intergenic Spacer*

MALDI-TOF - *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*

MDR - Resistência a Múltiplos Antimicrobianos

MLST - *Multilocus sequence typing*

PCR - *Polimerase Chain Reaction*

PFGE - *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

REP-PCR - *Repetitive Extragenic Palindromic Sequence - Polymerase Chain Reaction*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Histórico.....	14
2.2 Taxonomia.....	15
2.3 Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> - <i>Acinetobacter baumannii</i> (Complexo ABC) ..	18
2.3.1 Características das espécies do Complexo ABC.....	18
2.3.2 Epidemiologia e resistência aos antibióticos do <i>A. baumannii</i> .....	19
2.4 Métodos de Identificação.....	20
2.4.1 Métodos Fenotípicos .....	20
2.4.2 Métodos Genotípicos.....	22
2.4.3 Tipagem Molecular .....	25
3. JUSTIFICATIVA.....	27
4. OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivos gerais .....	28
4.2 Objetivos específicos .....	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29
7. ARTIGO 1 EM INGLÊS (Submitted to Brazilian Journal of Infectious Diseases).....	36
8. ARTIGO 2 EM INGLÊS ( short form paper submitted to Journal of Clinical Microbiology) .....	46
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

Durante anos o gênero atualmente conhecido como *Acinetobacter* sp foi denominado com diferentes expressões: *Micrococcus calcoaceticus*, *Bacterium anitratum* e *Achromobacter*. Somente em 1957, Brisou e Prevout descreveram um novo gênero para as espécies não-móveis de *Achromobacter*, e o denominaram *Acinetobacter* sp. Entretanto, somente em 1968, após um estudo aprofundado das características do novo gênero, é que a denominação *Acinetobacter* foi aceita pelos taxonomistas (1).

Inicialmente, só existiam duas espécies aceitas para o gênero: *Acinetobacter calcoaceticus* e *Acinetobacter lwoffii*. Porém, estudos posteriores demonstraram que o gênero era composto de inúmeras espécies que aos poucos foram sendo descritas. Nesse sentido, novas espécies foram nomeadas tendo como base estudos fenotípicos e de hibridização do DNA. A variedade desse gênero é tão grande e complexa que novas espécies vêm sendo descobertas e nomeadas até os dias de hoje. Atualmente, o gênero contém 23 espécies com nomes válidos e 9 genoespécies provisoriamente designadas (2, 3).

Apesar de algumas espécies serem bem caracterizadas por métodos fenotípicos e genotípicos, existem 4 espécies desse gênero que são praticamente indistinguíveis pelos métodos usualmente utilizados. Esse grupo de 4 espécies foi denominado de Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*, compreendendo as espécies: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. genoespécie 3* e *A. genoespécie 13TU* (4).

Porém, apesar de serem muito semelhantes bioquimicamente, essas espécies possuem contextos epidemiológicos e clínicos diferentes. As espécies *A. baumannii*, *A. genoespécie 3* e *13TU* são encontradas com maior frequência em amostras clínicas humanas e estão relacionadas a grande parte das infecções nosocomiais. *A. baumannii* é a espécie mais prevalente, possuindo maior número de relatos de resistência e surtos. Já, *A. calcoaceticus* é comumente isolada do solo e da água, e ainda não observou-se relatos em doenças graves (2, 5).

Nesse sentido, a identificação de espécies para o entendimento e avaliação do contexto clínico e epidemiológico se faz necessário. Porém, atualmente, essa identificação é realizada apenas para a espécie *A. baumannii*, principalmente pela carência de uma metodologia rápida e confiável para ser aplicada. Assim, sem uma metodologia que diferencie

as espécies do ABC, a prevalência bem como a importância das espécies menos prevalentes do ABC fica comprometida.

A identificação das espécies do complexo ABC, através da aplicação de testes fenotípicos não-comerciais, já foi descrita. Porém, sua utilização torna-se muito laboriosa para a rotina laboratorial, visto que são realizados aproximadamente 37 testes fenotípicos. Por outro lado, a utilização de testes comerciais não seria a melhor alternativa, devido ao alto custo. Além disso, estudos demonstraram que os testes comerciais (API 20NE, Vitek 2, Phoenix e MicroScan WalkAway) podem não apresentar resultados fidedignos. Algumas metodologias baseadas na avaliação do DNA (*Intergenic Spacer* –ITS; 16s-23s do RNA ribossomal) necessitam de sequenciamento, só podendo ser realizadas em laboratórios de referência que disponibilizem esta tecnologia (6).

Devido às diversas dificuldades encontradas na rotina de identificação das espécies do complexo ABC, o uso de metodologias como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como, por exemplo, o Multiplex PCR do gene *gyrB*, torna-se uma alternativa promissora. O uso dessa técnica possibilita resultados rápidos e de baixo custo, podendo, ainda, auxiliar-nos no entendimento da prevalência e da relevância clínica das espécies, como também no conhecimento das espécies menos prevalentes do complexo (5-7).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Histórico

Morax, em 1896, e Axenfeld, um pouco mais tarde, relataram a presença de um diplobacilo gram-negativo possível causador de conjuntivite. Acreditava-se que esse microorganismo necessitava de fluídos biológicos para sua sobrevivência. Após essa descoberta, Petit descreveu um "diplobacilo liquefiant", isolado de um paciente com úlcera de córnea, que se assemelhava ao descrito anteriormente, porém crescia em meios de cultura sem soro e liquefazia a gelatina (1, 3).

Posteriormente a essas descobertas, ocorreram vários relatos semelhantes de espécies da família atualmente denominada *Moraxellaceae*. Contudo, somente em 1911, o microbiologista alemão Beijerinck estudou um microrganismo isolado do solo em meio enriquecido com cálcio-acetato o qual nomeou de *Micrococcus calco-aceticus*, mas não o descreveu. Seus isolados foram estudados e descritos anos após sua descoberta. Dentre as diversas opções de nomenclatura sugeridas, um dos possíveis nomes para o isolado foi *Bacterium anitratum*. Espécie que foi descrita por Schaub e Hauber em 1948 (1, 2).

Em 1939, um grupo de espécies gram-negativas foi descrito por DeBord e denominado *Mimeae* pelo fato de "imitarem" *Neisseria* sp. Porém, logo após, em 1942, ele descreveu a família como sendo composta de 3 espécies: *Mima polymorpha*, *Colloides anoxydana* e *Herellea vaginicola* - que era confundida com *Bacterium anitratum* (1).

Alguns anos depois, em 1948, Schaub e Hauber descreveram um microrganismo em forma de coco e cocobacilar que não reduzia nitrato a nitrito e oxidava algumas aldoses, nomeando-o de *Bacterium anitratum*. Seguindo, em 1954, Brisou propôs que a espécie *B. anitratum* fosse incluída no gênero *Achromobacter*. Entretanto, em 1957, ele e Prevot nomearam um novo gênero, *Acinetobacter* (designação do grego *akinetos* - não móveis) para as espécies não-móveis do grupo *Achromobacter* (1, 2).

Somente a partir de 1968 que essa designação proposta foi bem aceita, quando Baumann et. al. realizou uma pesquisa aprofundada sobre o novo gênero. O pesquisador analisou características como: produção de ácido pela glicose, produção de gelatinase, lipase, capacidade de utilizar fontes de carbono, entre outros, e designou os agrupamentos de espécies através de suas características, confirmando a hipótese de Brisou e Prevot (2, 8).

Posteriormente ao relato de Baumann *et. al.*, houve o reconhecimento do gênero pelo *Subcommittee on the Taxonomy of Moraxella and Allied Bacteria* em 1971, e em 1974 o gênero *Acinetobacter* foi descrito no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* com uma única espécie *A. calcoaceticus* (2).

Em que pese no Manual houvesse sido relatado somente a espécie *A. calcoaceticus*, na “*Approved List of Bacterial Names*” foram descritas duas espécies *A. calcoaceticus* e *A. lwoffii*, pois algumas espécies possuíam a característica de não acidificarem a glicose. Ainda, outras literaturas propuseram novas subdivisões de *A. calcoaceticus* em biovars: *A. calcoaceticus* *bv. anitratus* e *A. calcoaceticus* *bv. lwoffii*. Todavia, essas não foram bem aceitas pelos taxonomistas (2).

## 2.2 Taxonomia

Atualmente, o gênero *Acinetobacter* pode ser classificado como pertencente a família *Moraxellaceae* e ordem *Gammaproteobacteria* (que inclui *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* e organismos relacionados) e apresenta-se como cocobacilos gram-negativos com tendência à duplo-arranjo, aeróbio estrito, catalase positiva, oxidase negativa, imóvel, não-fermentador e não-fastidioso. Suas colônias usualmente medem 1,0-2,0 mm de diâmetro, crescendo bem em meios usuais, possuindo um conteúdo total de G+C em seu DNA de 39% a 47% (2, 9).

Porém, sua história taxonômica é um tanto complexa. Mesmo após a descrição do gênero por Brisou e Prevot em 1957 e o reconhecimento do gênero subsequente ao delinamento feito por Baumann em 1968, só haviam 2 espécies descritas no “*Approved List of Bacterial Names*” (*A. calcoaceticus* e *A. lwoffii*), e uma no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (*A. calcoaceticus*), ainda que o gênero demonstrasse heterogeneidade bioquímica e genética (2, 10).

Assim, Bouvet e Grimont em 1986, definiram 12 grupos genômicos (genoespécies). Analizaram-os pela homologia do DNA, por suas propriedades bioquímicas e nomearam aqueles grupos identificáveis. Com base em seus estudos, eles confirmaram as espécies *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii*, *A. haemolyticus* sp. nov. e propuseram três novas espécies: *A. baumannii*, *A. johnsonii*, e *A. junii*. Porém, cabe ressaltar que alguns grupos ainda não eram bem distinguíveis (10).

No ano seguinte, Bouvet e Grimont propuseram técnicas bioquímicas para desenvolver um "sistema de biotipificação" para *A. baumannii* que baseava-se em crescimento a 37, 41 e 44°C, produção de ácido a partir da glicose, hidrólise de gelatina e utilização de 14 fontes de carbono. Nesse contexto, definiu-se as características das espécies já descritas e de outras 6 espécies com padrão diferenciado das demais que não haviam sido nomeadas. Esse sistema foi muito utilizado para identificação de novas espécies (10).

A partir de então, realizaram-se diversos trabalhos resultando em descrições de novas espécies, a exemplo da espécie *A. radioresistens* (isolado do solo e algodão) que foi descrita como grupo 12 por Bouvet e Grimont. Outros estudos acabaram descrevendo espécies sinônimas: *A. lwoffii* e *A. genoespécie 9* descritas por Bouvet e Jeanjean como 14BJ, e *A. genoespécie 13* descrita por Tjernberg e Ursing como 13TU (11-13).

Outras espécies de origem humana, tais como *A. parvus*, *A. schindleri*, e *A. ursingii*, e isolados a partir de plantas do lodo na Austrália e *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandoii*, e *A. gernerii* - foram descritas posteriormente (9, 14, 15).

O número de genoespécies descritas desse gênero é crescente. Atualmente, o gênero contém aproximadamente 28 espécies com nomes válidos e 9 genoespécies provisoriamente designadas (tabela 1). Algumas espécies por terem um maior destaque devido à sua relevância clínica têm seu estudo aprofundado para facilitar suas distinções na rotina laboratorial. Nesse sentido, as espécies *A. genoespécie 3* e *A. genoespécie 13TU* receberam por Nemeč *et. al.* denominações formais de nomenclatura, *Acinetobacter pittii* sp. nov. e *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov, respectivamente, a partir de um estudo aprofundado de suas características genotípicas e fenotípicas. Desse mesmo modo foram propostas as denominações de *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. para *A. genoespécie 10*, e de *Acinetobacter guillouiae* sp. nov para *A. genoespécie 11*, em 2010 (2, 6, 16).



**Tabela 1. Descrição das espécies do gênero *Acinetobacter* sp**

Nome da Espécie	Genoespécie <sup>a</sup>	Referência
<i>A. baumannii</i>	2	Bouvet, P.J.M. E Grimont, P. A.D., 1986
<i>A. baylyi</i>		Carr, E.L., <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter beijerinckii</i> sp. nov.		Nemec, A., <i>et al.</i> , 2009
<i>A. bouvetii</i>		Carr, E.L., <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter brisouii</i> sp. nov.		Anandham, R., <i>et al.</i> , 2010
<i>A. calcoaceticus</i>	1	Bouvet, P.J.M. E Grimont, P. A.D., 1986
<i>A. gernerii</i>		Carr, E.L., <i>et al.</i> , 2003
<i>A. grimontii</i>		Carr, E.L., <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i> sp. nov.		Nemec, A., <i>et al.</i> , 2009
<i>A. haemolyticus</i>	4	Bouvet, P.J.M. E Grimont, P. A.D., 1986
<i>Acinetobacter indicus</i> sp.		Malhotra, J., <i>et al.</i> , 2012
<i>A. johnsonii</i>	7	Bouvet, P.J.M. E Grimont, P. A.D., 1986
<i>A. junii</i>	5	Bouvet, P.J.M. E Grimont, P. A.D., 1986
<i>Acinetobacter kyonggiensis</i> sp. nov.		Lee, H.J. E. Lee, SS, 2010
<i>A. lwoffii</i>	8 / 9	Bouvet, P.J.M. E Grimont, P. A.D., 1986
<i>A. parvus</i>		Nemec, A. <i>et al.</i> , 2003
<i>A. radioresistens</i>	12	Nishimura, Y <i>et al.</i> , 1988
<i>A. schindleri</i>		Nemec, A. <i>et al.</i> , 2001
<i>A. tandoii</i>		Carr, E.L., <i>et al.</i> , 2003
<i>A. tjernbergiae</i>		Carr, E.L., <i>et al.</i> , 2003
<i>A. towneri</i>		Carr, E.L., <i>et al.</i> , 2003
<i>A. ursingii</i>		Nemec, A. <i>et al.</i> , 2001
<i>A. pittii</i> <sup>b</sup>	3	Nemec, A. <i>et al.</i> , 2011
	6	
<i>A. bereziniae</i> <sup>c</sup>	10	Nemec, A. <i>et al.</i> , 2010
<i>A. guillouiae</i> <sup>c</sup>	11	Nemec, A. <i>et al.</i> , 2010
<i>A. nosocomialis</i> <sup>b</sup>	13TU	Nemec, A. <i>et al.</i> , 2011
<i>Acinetobacter oryzae</i> sp.nov.		Chaudhary, H.J. <i>et al.</i> , 2012
<i>Acinetobacter soli</i> sp. nov.		Kim, D. <i>et al.</i> , 2008
	13BJ, 14TU	Bouvet, P. J.M. E Jeanjean, S.,1989 E Tjenberg, I. E Ursing, J., 1989
	14BJ	Bouvet, P. J.M. E Jeanjean, S.,1989
	15BJ	Bouvet, P. J.M. E Jeanjean, S.,1989
	15TU	Tjenberg, I. E Ursing, J., 1989
	16	Bouvet, P. J.M. E Jeanjean, S.,1989
	17	Bouvet, P. J.M. E Jeanjean, S.,1989
	Entre 1 e 3	Gerner-Shimidt, P. E Tjenberg I., 1993
	Similar 13TU	Gerner-Shimidt, P. E Tjenberg I., 1993

Adaptado de Peleg, A. Y. *et al.*,2008

<sup>a</sup> Genoespécies de acordo com BOUVET, P.J.M. and GRIMONT, P. A.D., 1987 e BOUVET, P. J.M. e JEANJEAN, S.,1989.

<sup>b</sup> Proposta de nomenclatura de NEMEC, A. et. al. em 2011.

<sup>c</sup> Proposta de nomenclatura de NEMEC, A. et. al em 2010.

BJ= Bouvet. e Jeanjean, S; TU= Tjernberg e Ursing.

A variedade desse gênero se exprime com a continua caracterização de novas espécies. Nessa direção, é possível citar as espécies *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov., *Acinetobacter indicus* sp. nov., *Acinetobacter oryzae* sp. nov., *Acinetobacter brisouii* sp. nov., *Acinetobacter soli* sp. nov., entre outras isoladas do meio ambiente, e espécies isoladas de amostras clínicas humanas como: *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. e *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov. (17-21).

Mesmo sendo descritas diversas técnicas de identificação, ainda existem 4 espécies muito próximas que são dificilmente distinguíveis fenotipicamente. Sendo assim, Gerner-Shimidt et. al. propuseram uma denominação para o grupo de Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (Complexo ABC), compreendendo os grupos 1, 2, 3 e 13 de Bouvet e Grimont, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. genoespécie 3* e *A. genoespécie 13TU*, respectivamente (4, 10).

## **2.3 Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (Complexo ABC)**

### 2.3.1 Características das espécies do Complexo ABC

As quatro espécies que compõem o complexo, apesar de compreenderem espécies indistinguíveis fenotípica e bioquimicamente, possuem diferenças entre si. As espécies *A. baumannii*, *A. genoespécie 3* e *13TU* são encontradas com maior frequência em amostras clínicas humanas e estão relacionadas a grande parte das infecções nosocomiais . Já, a espécie *A. calcoaceticus* é comumente isolada do solo e da água, e ainda não foi descrita em relatos de doenças sérias (2, 5).

No que tange aos desfechos clínicos, Lee et. al. investigou o impacto do complexo ABC, tendo como resultado uma associação da espécie *A. baumannii* que apresenta maiores taxas de mortalidade em bacteremias quando comparado a outras espécies do complexo.

Outros dois estudos conduzidos em Taiwan também demonstraram a associação da espécie *A. baumannii* com maiores taxas de sepses e mortalidade em comparação às espécies não-*baumannii*, especialmente a espécie 13TU (17, 22, 23).

As espécies não só se diferenciam no contexto clínico epidemiológico, como, ainda, no que diz respeito à resistência à antimicrobianos. Ko et. al. em seu estudo destacou a diferença significativa de sensibilidade entre *A. baumannii* e *A. genoespécie 3*. Nesse trabalho, todas as amostras testadas de *A. genoespécie 3* foram sensíveis aos antimicrobianos ampicilina-sulbactam, imipenem e meropenem. Já, as espécies de *A. baumannii* apresentaram de 67 à 90% de resistência aos mesmos. Nesse sentido, Lin et. al. também encontrou altas taxas de sensibilidade a antimicrobianos, principalmente ciprofloxacino e ampicilina-sulbactam, para as espécies *A. genoespécie 3* e 13TU. Em contrapartida, *A. baumannii* apresentou altas taxas de resistência (24, 25).

### 2.3.2 Epidemiologia e resistência aos antibióticos do *A. baumannii*

Entre as quatro espécies do complexo, destaca-se a espécie *Acinetobacter baumannii*, por ser a espécie mais comumente envolvida com infecções hospitalares, por apresentar resistência a múltiplos antimicrobianos (MDR) e casos de "pan-resistência" (5, 26).

Desse modo, Peleg et. al. propôs uma definição para isolados MDR, já que a literatura apresentava posição divergente. Assim, os isolados MDR seriam aqueles resistentes a mais de dois antibióticos dentre as cinco principais classes de antimicrobianos: cefalosporinas, carbapenêmicos, ampicilina-sulbactam, fluorquinolonas e aminoglicosídeos. Já, os isolados pan-resistentes são aqueles resistentes à todos antimicrobianos de primeira linha: todos os  $\beta$ -lactâmicos (incluindo carbapenêmicos e sulbactam com CIM  $<4\mu\text{g/mL}$ ), fluorquinolonas e aminoglicosídeos. No entanto com o aumento no uso de polimixinas e tigeciclina provavelmente irá englobar estes outros agentes (2).

Além da resistência aos antibióticos, o *A. baumannii* apresenta outra característica que é sua capacidade de disseminação em vários continentes e, conseqüentemente, de causar surtos. Na Europa, vários relatos de surtos foram, em meados dos anos 80, descritos na Inglaterra, Portugal, França, Espanha, Bélgica e Alemanha; sendo que três clones principais de *A. baumannii* (denominados clones I, II e III) foram identificados. Estes clones, mais tarde, foram descritos em outros países da Europa (2, 27-32).

Já, na América do Norte os relatos de *A. baumannii* MDR ocorreram primeiramente nos anos 90, em Nova York, e a partir de então houveram inúmeros relatos em distintas regiões dos Estados Unidos. Vale ressaltar os importantes casos de surtos dessa espécie entre os soldados em combate nas guerras do Iraque e Afeganistão, o que contribuiu para a disseminação da espécie nesses países (33-39).

No continente Asiático e no Oriente Médio existem numerosos casos de pan-resistência e de isolados MDR de *A. baumannii*. Em contrapartida na África, especificamente na África do Sul, relataram-se poucos casos de ocorrência do patógeno MDR (2, 40-44).

Na América Latina encontram-se as maiores taxas de resistência aos carbapenêmicos, piperacilina-tazobactam, ciprofloxacino e gentamicina. Recentemente, Gales et. al. demonstraram que os isolados de *Acinetobacter* sp. apresentaram altos índices de resistência à todos antimicrobianos pesquisados, com exceção da colistina. Constatação que vai de encontro ao estudo de Martins et. al. e Ferreira et. al., no Sul do Brasil, onde evidenciaram altos níveis de isolados MDR (45-48).

## **2.4 Métodos de Identificação**

Pelo fato de existirem diferenças epidemiológicas entre as espécies do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*, a identificação em nível de espécie se torna necessária. Vários métodos já foram descritos até o momento, porém são caros, demorados e laboriosos para a aplicação na rotina laboratorial. Novas metodologias e inovações em antigos testes vêm sendo testadas para facilitar essa identificação.

### **2.4.1 Métodos Fenotípicos**

Os métodos fenotípicos utilizados para a identificação das espécies do complexo foram inicialmente estudados por Bouvet e Grimont em 1987. Os dois pesquisadores definiram alguns testes bioquímicos para identificação de espécies do gênero *Acinetobacter* sp. Através da temperatura de crescimento, produção de ácido a partir da glicose, hidrólise da gelatina e utilização de fontes de carbono era possível agrupar as espécies que eram frequentemente encontradas em infecções nosocomiais (tabela 2) (10).

**Tabela 2. Caracterização bioquímica das espécies do complexo ABC**

	<i>Acinetobacter baumannii</i> <sup>a</sup>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <sup>a</sup>	<i>Acinetobacter</i> genoespécie 3 ( <i>A. pittii</i> ) <sup>a</sup>	<i>Acinetobacter</i> genoespécie 13TU ( <i>A. nosocomialis</i> ) <sup>b</sup>
Crescimento á 44°C	+	-	-	-----
Crescimento á 41°C	+	-	+	-----
Crescimento á 37°C	+	+	+	<i>d</i>
Ácido a partir da D-glicose	+	+	+	+
Hidrólise da gelatina	-	-	-	-
Utilização das fontes de carbono:				
DL-lactato	+	+	+	-----
DL-4aminobutirato	+	+	+	-
Transaconitrato	+	+	+	-
Citrato	+	+	+	-----
Glutarato	+	+	+	-
Aspartato	+	+	+	-----
Azelato	+	+	+	-
β- Alanina	+	+	+	-
L-histidina	+	+	+	-----
D-Malato	+	-	+	-----
Malonato	+	+	<i>d</i>	-
Histamina	-	-	-	-----
L-fenilalanina	<i>d</i>	+	<i>d</i>	-----
Fenilacetato	<i>d</i>	+	<i>d</i>	-----

Tabela adaptada de BOUVET e GRIMONT, 1987; BOUVET e JEANJEAN, 1989.

<sup>a</sup> BOUVET, P. J. M. e GRIMONT, P. A.D., 1987.

<sup>b</sup> BOUVET, P. J. M. e JEANJEAN, S., 1989.

(+) 90-100% positivo

(-) 0-10% positivo

(d) 11-89% positivo

(-----) Não descrito

Bouvet e Jeanjean em 1989 propuseram modificações nesses testes acrescentando mais fontes de carbono e obtendo caracterização de mais grupos deste gênero. Até esse momento, não haviam sido caracterizados grupos muito semelhantes entre si perante os resultados de tais testes, e não haviam dados suficientes para garantir a reprodutibilidade de resultados (12).

Gerner-Smidt, em um estudo aprofundado sobre os testes bioquímicos já descritos, avaliou a probabilidade da correta identificação das espécies obtendo resultado satisfatório com 78% dos isolados corretamente identificados. Nesse estudo, também foi descrito, pela primeira vez, a similaridade do complexo ABC no tocante aos testes bioquímicos, sugerindo seu agrupamento (4).

Com o avanço das metodologias de identificação através do DNA, os testes fenotípicos têm sofrido pequenas modificações ao longo do tempo, porém apenas têm destaque os testes utilizados por aqueles autores cujo o intuito é identificar novas espécies. No entanto, na rotina laboratorial tais testes apresentam dificuldades devido ao elevado custo com reagentes e a demora para obtenção de resultados (6, 21, 49, 50).

Atualmente, existem alguns sistemas fenotípicos comerciais para identificação como: API 20NE, Vitek 2, Phoenix, e MicroScan WalkAway. Os testes fenotípicos comerciais, no entanto, podem apresentar baixo desempenho. Usando esses sistemas, apenas 25% dos isolados clinicamente relevantes do complexo ABC são comumente identificadas como *A. baumannii*. Da mesma forma, os métodos rotineiramente utilizados no laboratório não são suficientemente discriminatórios para diferenciação dessas espécies. Sendo assim, os métodos moleculares parecem ser a melhor alternativa para a diferenciação do complexo ABC (5, 7).

#### 2.4.2 Métodos Genotípicos

Desde o início das descobertas de similaridade entre os testes fenotípicos das espécies do gênero, foram propostas metodologias baseadas no estudo do DNA para a diferenciação em nível de espécie. Testes, através da hibridização do DNA realizados por Bouvet e Grimont em 1986, iniciaram as classificações genotípicas, subdividindo o gênero em 12 genoespécies conforme sua homologia (10).

Posteriormente, foram propostas outras metodologias para a identificação mais precisa e para tornar mais rápido o processo. Com o advento do sequenciamento do DNA, metodologias baseadas no *Intergenic Spacer* (ITS) 16s-23s do RNA ribossomal ganharam destaque. O gene 16s rRNA é composto por 1.550 pares de bases (pb) e possui regiões conservadas e variadas. Tanto esse gene como o 23s e o ITS 16s-23s, também ribossomais são geralmente utilizados para identificação de espécies. Porém, como a variação no DNA do

complexo é pequena, o ITS 16s-23s vem sendo mais utilizado devido ao fato de possuir baixos graus de variação intraespécies e altos graus de variação interespecíes (51-53).

Dolzani et. al. em 1995 e Chang et. al., dez anos mais tarde, utilizaram a amplificação através da *Polimerase Chain Reaction* (PCR) do espaço intergênico rRNA, para a identificação das espécies do complexo ABC. O diferencial dos dois estudos foi a utilização de enzimas de restrição para avaliação das espécies através do padrão de bandas em gel de agarose ou o uso da técnica de sequenciamento do fragmento obtido e purificado para a identificação. Esse método, apesar de ter resultados confiáveis é pouco utilizado rotineiramente, pois é necessário o sequenciamento de cada fragmento obtido pelo PCR para a confirmação da espécie, visto que os fragmentos têm tamanhos semelhantes (tabela 3 e figura 1) (51, 54).

**Tabela 3. Tabela de primers e tamanho de fragmentos obtidos pelo PCR.**

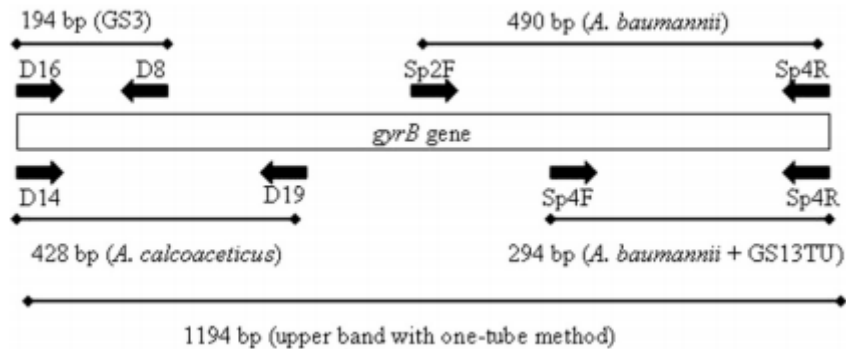
	Tamanho fragmentos PCR (pb)			
	A. <i>baumanni</i>	A. <i>calcoaceticus</i>	A. <i>genoespécie</i> 13TU <sup>a</sup>	A. <i>genoespécie</i> 3 <sup>b</sup>
<b>Primer ITS 16s-23s</b>				
1512F 5'GTCGTAACAAGGTAGCCGTA3'	607	638	615	619
6R 5'GGGTTYCCCCRTTCRGAAT3'				
<b>Primers PCR Multiplex gyrB</b>				
D14 5'GACAACAGTTATAAGGTTTCAGGTG3'	294 e 490	428	294	194
D19 5'CCGCTATCTGTATCCGCAGTA3'				
D16 5'GATAACAGCTATAAAGTTTCAGGTGGT3'				
D8 5'CAAAAACGTACAGTTGTACCACTGC3'				
Sp2F 5'GTTCCCTGATCCGAAATTCTCG3'				
Sp4F 5'CACGCCGTAAGAGTGCATTA3'				
Sp4R 5'AACGGAGCTTGTCAGGGTTA3'				

pb= pares de bases

<sup>a</sup> *Acinetobacter nosocomialis*

<sup>b</sup> *Acinetobacter pittii*

**Figura 1. Esquema de anelamento dos primers Multiplex PCR gyrB**



Fonte: HIGGINS, P. G. et. al., 2010

Diagrama esquemático demonstrando o anelamento dos *primers* e o tamanho esperado dos fragmentos de PCR usando os primers apresentados na tabela 3.

Outros genes conservados vêm sendo estudados individualmente para a identificação do complexo ABC como: *rpoB*, *recA* e *gyrB*. No que diz respeito ao gene *rpoB*, que codifica a subunidade  $\beta$  da enzima RNA polimerase, La Scola et. al., em 2006, descobriram que esse gene possuía 4 zonas hipervariáveis, duas dentro do gene e duas flanqueando-o. Um desses fragmentos foi nomeado de *zonal* 350pb e demonstrou nesse estudo ser o mais útil na identificação das espécies do gênero *Acinetobacter sp.* Tal descoberta foi confirmada posteriormente em novo estudo para as espécies do complexo ABC, onde utilizou-se *primers* da *zonal* do gene *rpoB* para a realização do PCR com posterior sequenciamento do fragmento. Porém, assim como as demais metodologias que envolvem sequenciamento, seu uso em laboratórios de rotina é, ainda, muito raro(55, 56).

O gene *recA* também é utilizado individualmente para identificação de espécies do ABC. Este gene codifica uma proteína indispensável para a manutenção e diversificação do material genético bacteriano. Ainda, ressalta-se o seu importante papel para assegurar a viabilidade das células, ou seja, é uma proteína simultaneamente ubíqua e conservada entre os procariontes. Nesse sentido, há estudos utilizando a análise de restrição dos produtos de amplificação dos fragmentos desse gene para a identificação das espécies do complexo ABC. No entanto, os autores sugerem que esse método seja utilizado como identificação preliminar, sendo necessário outro método de identificação ou sequenciamento para confirmação da espécie (57, 58).



Ao longo do tempo, algumas alternativas ao sequenciamento foram testadas. Uma delas foi o Multiplex PCR para o gene *gyrB*. O gene *gyrB* corresponde ao fragmento que codifica a subunidade  $\beta$  da enzima DNA girase e que ao longo dos estudos de análise de multilocus apresentou heterogeneidade intraespécie, o que o torna um bom candidato para identificação do complexo ABC. Valendo-se de tal informação, Higgins et. al. realizaram estudos utilizando o multiplex PCR para o gene *gyrB* para, primeiramente, distinguir as espécies *A. baumannii* e *A. nosocomialis*. No ano de 2007 e posteriormente em 2010, realizaram um multiplex PCR contendo 7 *primers* para distinguir as quatro espécies do complexo. Então, esse método torna-se uma boa opção para a identificação das espécies, visto que é um método rápido e barato para ser utilizado rotineiramente não exigindo sequenciamento nem confirmação por outra metodologia pela fácil distinção através da análise de fragmentos (tabela 3) (59, 60).

Recentemente, com o avanço da tecnologia envolvendo a identificação pelo DNA, surgiram novas técnicas, como o Microarray que identifica um grande número de amostras ao mesmo tempo. Nessa direção, foram delineadas sondas para realização de Array para a identificação das espécies do complexo em um grande número de isolados ao mesmo tempo, com rapidez, sensibilidade e especificidade de 100%. Porém, é necessário que o laboratório possua a tecnologia e as sondas do Microarray, o que torna o método caro para a rotina laboratorial (24).

Outra técnica molecular (não necessariamente genotípica) recentemente estudada e que também obtém resultados rápidos (em minutos) é a *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF). Um estudo em 2011 demonstrou resultados de identificação com 98% de acurácia na identificação do complexo ABC, em aproximadamente 5 minutos. Porém essa metodologia também tem alto custo para ser aplicada na rotina laboratorial (61).

Embora todas as técnicas de identificação molecular descritas auxiliem na identificação das espécies com sensibilidade e especificidade, elas ainda estão restritas à laboratórios de referência, e apresentam alto custo para sua realização.

#### 2.4.3 Tipagem Molecular

Com o crescente número de infecções por esse micro-organismo e a disseminação da resistência, algumas metodologias de tipagem molecular vêm sendo utilizadas para o

delineamento e entendimento de surtos, objetivando ainda a avaliação da epidemiologia desse gênero. Como consequência, podem ser utilizadas também para identificação das espécies. Atualmente tais técnicas não são utilizadas para distinguir as espécies do complexo ABC. Tem-se como exemplo de metodologias: o *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Repetitive Extragenic Palindromic Sequence based Polymerase Chain Reaction* (REP-PCR), *Arbitrary Primer Sequence based Polymerase Chain Reaction* (AP-PCR), *Multilocus sequence typing* (MLST), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), Ribotipagem, entre outros. Todos os métodos de tipagem molecular, apesar de serem também utilizados para identificação de espécies, têm como principal utilidade a avaliação epidemiológica e a caracterização de surtos de *Acinetobacter* sp. (50, 62-65).

### 3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, uma importante causa de infecção nosocomial no Brasil está relacionada a emergência de bactérias Gram-negativas, em especial *Acinetobacter* sp., cuja importância está associada a crescente resistência aos antimicrobianos.

O conhecimento em nível de espécie, para esse gênero, se faz necessário visto que o denominado Complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*, apresenta espécies que são bioquimicamente muito semelhantes porém possuem contextos clínicos e epidemiológicos distintos. Devido à não caracterização rotineira das espécies, dados gerados por alguns estudos agrupam as espécies do complexo ABC, deixando o conhecimento epidemiológico e clínico dessas espécies ainda pouco esclarecido.

A distinção fenotípica para esse grupo de espécies ainda é muito complexa e laboriosa. De acordo com Nemec et. al. são necessários aproximadamente 37 testes para a correta identificação das espécies do complexo. Além disso, os testes comerciais disponíveis ainda não têm poder de discriminação suficiente entre as espécies do complexo ABC. Nesse sentido, a distinção não é realizada na rotina laboratorial devido à demora para obter os resultados e ao elevado custo. Por esses motivos, novas metodologias utilizando o DNA vêm sendo propostas, algumas ainda muito caras para serem aplicadas na rotina.

Assim, esse trabalho utilizou técnicas moleculares baseadas no DNA para a identificação das espécies do complexo permitindo o conhecimento da distribuição das espécies do gênero *Acinetobacter* sp. presentes nas infecções nosocomias. Além disso, padronizou a identificação através do Multiplex PCR para o gene *gyrB*, que é um método fácil e de baixo custo, podendo ser amplamente difundido e utilizado na rotina laboratorial.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos gerais

Avaliação de método de identificação molecular, distribuição das espécies e seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Padronizar a técnica de Multiplex PCR do gene *gyrB* para identificação de espécies;
- Comparar os resultados obtidos entre a técnica de PCR para o gene *gyrB* com o padrão-ouro para identificação das espécies (sequenciamento da região intergênica 16S-23S)
- Determinar a prevalência da espécie *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A.* genoespécie 13TU e *A.* genoespécie 3 nos isolados de *Acinetobacter* sp.;
- Determinar o perfil de susceptibilidade dos isolados, usando a microdiluição em caldo para tigeciclina, polimixina B e imipenem;
- Identificar a presença de genes de resistência (*bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> and *bla*<sub>OXA-143</sub>) nos isolados de *Acinetobacter* sp.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Henriksen SD. Moraxella, *Acinetobacter*, and the Mimeae. *Bacteriol Rev.* 1973;37(4):522-61.
2. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):538-82.
3. Peleg AY, de Breij A, Adams MD, Cerqueira GM, Mocali S, Galardini M, et al. The success of *acinetobacter* species; genetic, metabolic and virulence attributes. *PLoS One.* 2012;7(10):e46984.
4. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol.* 1991;29(2):277-82.
5. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(12):939-51.
6. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol.* 2011;162(4):393-404.
7. Wisplinghoff H, Edmond MB, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP, Seifert H. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis.* 2000;31(3):690-7.
8. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol.* 1968;95(5):1520-41.
9. Nemec A, De Baere T, Tjernberg I, Vanechoutte M, van der Reijden TJ, Dijkshoorn L. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(Pt 5):1891-9.

10. Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. 1987;138(5):569-78.
11. Nishimura Y, Kanzaki H, Iizuka H. Taxonomic studies of *Acinetobacter* species based on the electrophoretic analysis of enzymes. *J Basic Microbiol*. 1988;28(6):363-70.
12. Bouvet PJ, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res Microbiol*. 1989;140(4-5):291-9.
13. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS*. 1989;97(7):595-605.
14. Nemec A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, Van Der Reijden TJ, et al. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(Pt 5):1563-7.
15. Carr EL, Kämpfer P, Patel BK, Gürtler V, Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(Pt 4):953-63.
16. Nemec A, Musílek M, Sedo O, De Baere T, Maixnerová M, van der Reijden TJ, et al. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(Pt 4):896-903.
17. Lee HJ, Lee SS. *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov., a  $\beta$ -glucosidase-producing bacterium, isolated from sewage treatment plant. *J Microbiol*. 2010;48(6):754-9.
18. Malhotra J, Anand S, Jindal S, Raman R, Lal R. *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from hexachlorocyclohexane (HCH) dumpsite. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012.
19. Chaudhary HJ, Peng G, Hu M, He Y, Yang L, Luo Y, et al. Genetic diversity of endophytic diazotrophs of the wild rice, *Oryza alta* and identification of the new diazotroph, *Acinetobacter oryzae* sp. nov. *Microb Ecol*. 2012;63(4):813-21.
20. Anandham R, Weon HY, Kim SJ, Kim YS, Kim BY, Kwon SW. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. *J Microbiol*. 2010;48(1):36-9.

21. Nemeč A, Musílek M, Maixnerová M, De Baere T, van der Reijden TJ, Vaneechoutte M, et al. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59(Pt 1):118-24.
22. Chuang YC, Sheng WH, Li SY, Lin YC, Wang JT, Chen YC, et al. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with acinetobacter bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2011;52(3):352-60.
23. Lee YC, Huang YT, Tan CK, Kuo YW, Liao CH, Lee PI, et al. *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13TU and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(8):1839-46.
24. Ko WC, Lee NY, Su SC, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Wang LR, et al. Oligonucleotide array-based identification of species in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex in isolates from blood cultures and antimicrobial susceptibility testing of the isolates. *J Clin Microbiol.* 2008;46(6):2052-9.
25. Lin YC, Sheng WH, Chang SC, Wang JT, Chen YC, Wu RJ, et al. Application of a microsphere-based array for rapid identification of *Acinetobacter* spp. with distinct antimicrobial susceptibilities. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):612-7.
26. Montefour K, Frieden J, Hurst S, Helmich C, Headley D, Martin M, et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. *Crit Care Nurse.* 2008;28(1):15-25; quiz 6.
27. Bogaerts P, Naas T, Wybo I, Bauraing C, Soetens O, Piérard D, et al. Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11):4189-92.
28. Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, et al. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol.* 2006;44(10):3623-7.
29. Da Silva G, Dijkshoorn L, van der Reijden T, van Strijen B, Duarte A. Identification of widespread, closely related *Acinetobacter baumannii* isolates in Portugal as a subgroup of European clone II. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(2):190-5.

30. Naas T, Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K, Bajolet O, Bernet C, et al. VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(8):1214-22.
31. Schulte B, Goerke C, Weyrich P, Gröbner S, Bahrs C, Wolz C, et al. Clonal spread of meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in hospitals in the Mediterranean region and transmission to South-west Germany. *J Hosp Infect.* 2005;61(4):356-7.
32. Vila J, Ruiz J, Navia M, Becerril B, Garcia I, Perea S, et al. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J Clin Microbiol.* 1999;37(3):758-61.
33. Adams-Haduch JM, Onuoha EO, Bogdanovich T, Tian GB, Marschall J, Urban CM, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J Clin Microbiol.* 2011;49(11):3849-54.
34. Calhoun JH, Murray CK, Manring MM. Multidrug-resistant organisms in military wounds from Iraq and Afghanistan. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466(6):1356-62.
35. Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(8):1218-24.
36. Go ES, Urban C, Burns J, Kreiswirth B, Eisner W, Mariano N, et al. Clinical and molecular epidemiology of acinetobacter infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet.* 1994;344(8933):1329-32.
37. 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):2941-5.
38. Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, et al. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. *Clin Infect Dis.* 2007;44(12):1577-84.



39. Wright MO, (APIC) GBCotAfPiICaE. Multi-resistant gram-negative organisms in Maryland: a statewide survey of resistant *Acinetobacter baumannii*. Am J Infect Control. 2005;33(7):419-21.
40. Chaulagain BP, Jang SJ, Ahn GY, Ryu SY, Kim DM, Park G, et al. Molecular epidemiology of an outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbal-bla(OXA-51-like) genes in a Korean hospital. Jpn J Infect Dis. 2012;65(2):162-6.
41. Houang ET, Chu YW, Leung CM, Chu KY, Berlau J, Ng KC, et al. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter spp.* in Hong Kong. J Clin Microbiol. 2001;39(1):228-34.
42. Iredell J, Thomas L, Power D, Mendes E. Tigecycline resistance in Australian antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother. 2007;59(4):816-8.
43. Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T, et al. Metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. J Clin Microbiol. 2004;42(11):5256-63.
44. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(10):3471-84.
45. Ferreira AE, Marchetti DP, da Cunha GR, de Oliveira LM, Fuentefria DB, Dall Bello AG, et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter sp.* from hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44(6):725-30.
46. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73(4):354-60.
47. Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL, Force C-PST. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. Am J Infect Control. 2012;40(2):108-12.

48. Unal S, Garcia-Rodriguez JA. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* isolated in the MYSTIC Program, 2002-2004. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;53(4):265-71.
49. Dijkshoorn L, Van Harsselaar B, Tjernberg I, Bouvet PJ, Vaneechoutte M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Syst Appl Microbiol.* 1998;21(1):33-9.
50. Gerner-Smidt P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol.* 1992;30(10):2680-5.
51. Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1632-9.
52. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):840-62, table of contents.
53. Whiley RA, Duke B, Hardie JM, Hall LM. Heterogeneity among 16S-23S rRNA intergenic spacers of species within the '*Streptococcus milleri* group'. *Microbiology.* 1995;141 ( Pt 6):1461-7.
54. Dolzani L, Tonin E, Lagatolla C, Prandin L, Monti-Bragadin C. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. *J Clin Microbiol.* 1995;33(5):1108-13.
55. Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B. Validation of partial rpoB gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter species*. *Microbiology.* 2009;155(Pt 7):2333-41.
56. La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the rpoB gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter species*. *J Clin Microbiol.* 2006;44(3):827-32.

57. Krawczyk B, Lewandowski K, Kur J. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. *Mol Cell Probes*. 2002;16(1):1-11.
58. Nowak A, Kur J. Genomic species typing of acinetobacters by polymerase chain reaction amplification of the *recA* gene. *FEMS Microbiol Lett*. 1995;130(2-3):327-32.
59. Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(12):1199-201.
60. Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H. *gyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *J Clin Microbiol*. 2010;48(12):4592-4.
61. Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect*. 2011.
62. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*. 2000;6(12):635-43.
63. Gouby A, Carles-Nurit MJ, Bouziges N, Bourg G, Mesnard R, Bouvet PJ. Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 1992;30(6):1588-91.
64. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4382-90.
65. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, et al. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol*. 1996;34(6):1519-25.

## 7. ARTIGO 1 EM INGLÊS (Submitted to Brazilian Journal of Infectious Diseases)

Specie identification by a feasible molecular method and susceptible profile of the species of  
*Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex

Aline Borges Teixeira<sup>1</sup>, Andreza Francisco Martins<sup>2</sup>, Juliana Barin<sup>1</sup>, Djuli Milene Hermes<sup>1</sup>,  
Caroline Pormann<sup>3</sup>, Afonso Luis Barth<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Medical Sciences Post-Graduate Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Surveillance Health, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Pharmacy Graduate , Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>4</sup> Infectious Diseases Unit, Hospital de Clínicas 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.

[amartins20@bol.com.br](mailto:amartins20@bol.com.br)

**Abstract: Introduction:** Nowadays the genus *Acinetobacter* sp. comprises 23 species with valid names and new species have been discovered. In this genus have four closely related species that are hardly distinguishable phenotypically and genetically named *Acinetobacter calcoaceticus*- *Acinetobacter baumannii* complex. **Methods:** In this work, we evaluated the multiplex PCR for *gyrB* gene to identify the species of the ABC complex confirmed by sequencing of ITS 16s-23s PCR fragment and we also analyze the susceptible profile of this species by microdilution broth. **Results:** We found 89,8% *A. baumannii*, 11.2% non-*baumannii* isolates. Most of *A. baumannii* proved to be non-susceptible to imipenem. Three out of 6 isolates of *A. nosocomialis* were also resistant to imipenem but only one *A. pittii* was resistant to this carbapenem. **Conclusion:** This findings suggested that the multiplex PCR of the *gyrB* is a feasible method to be used in the laboratory routine for differentiate species of ABC complex and showing the potential clinical significance of non-*baumannii* species.

## Introduction

Initially, only two species were described in the genus *Acinetobacter*: *A. calcoaceticus* and *A. lwoffii*. Later, Bouvet and Grimont defined 12 genospecies based in DNA-DNA hybridization. Thereafter, new species have been described and, currently, the genus comprises 23 species with valid names and 9 genomic species that were delineated by DNA-DNA hybridization (2-4).

Despite the fact that various identification methods have being described, there are still four closely related species that are hardly distinguishable phenotypically and genetically. These were referred as a group and named *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex (ABC complex) that comprises groups 1, 2, 3 e 13 of Bouvet and Grimont named *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. genoespécie 3* and *A. genoespécie 13TU*, respectively. More recently, *A. genoespécie 3* and *A. genoespécie 13TU* were formerly named *Acinetobacter pittii* sp. nov. e *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov, respectively, according to a detailed study of their genotypic and phenotypic characteristics (3-5).

It is of importance to distinguish among the species of the ABC as the different species may have distinct epidemiological and clinical contexts. The species *A. baumannii*, *A. pittii* and *A. nosocomialis* are found more frequently in clinical specimens and are largely related to nosocomial infections. Among them, *A. baumannii* is by far the species most commonly involved with nosocomial infections presenting resistance to multiple antibiotics (MDR). On the other hand, *A. calcoaceticus* is commonly isolated from soil and water, and not observed in reports of serious diseases (1, 6, 7).

*A. baumannii* has already been widely described as a cause of nosocomial infections, and it is associate with a high level of mortality and a poor outcome. Moreover, *A. baumannii* from outbreaks usually presents multidrug resistance. In contrast, only a few reports have described carbapenem resistance among *A. pittii* and *A. nosocomialis* (8-10).

In order to differentiate and better understand the clinical and epidemiological significance of the ABC species, several methodologies have been described. Manual and semiautomated comercial identification present low performance to distinguish the species and phenotypic methods already described are very laborious to be performed in the routine laboratory. Methodologies based in nucleic acids (such as DNA-DNA hybridization,

amplified rRNA gene restriction analysis - ARDRA, tRNA spacer fingerprinting, rpoB gene and the 16S-23S rRNA gene spacer region) have improved the identification of these species but these methods are rarely used in the routine of microbiology laboratories as they are too expensive and the sequencing equipments are available only in a few specialized reference laboratories (3, 6, 11-16).

The gyrB gene corresponds to the fragment encoding the  $\beta$  subunit of the enzyme DNA gyrase and along with the multilocus analysis studies showed heterogeneity intraspecific. Therefore, analysis of the gyrB gene is a promising tool to differentiate species of ABC complex. Higgins *et. al.* proposed a multiplex PCR method with 7 primers targeting this gene which does not need DNA sequencing and, therefore, is a fast and less laborious method which would allow differentiation among ABC complex (17).

In this study we evaluated the multiplex PCR for gyrB gene to identify the species of the ABC complex and we also analyze the susceptible profile of this species.

## Methods

**Bacterial strains.** A total of 118 isolates obtained from patients attending two different hospitals in southern Brazil, during 2011, that were previously identified as *Acinetobacter* sp. by conventional methods were evaluated.

**DNA preparation.** The boiling method described by Vaneechoutte *et al.* was used to extract the DNA from the bacteria and was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further use (12).

**Amplification 16S-23S rRNA gene spacer (ITS) and sequencing.** The PCR used the bacterium-specific primers described by Chang *et. al.* The reaction performed as described previously with a few modifications. In total reaction volume  $25\mu\text{L}$  consisting of  $1,0\mu\text{M}$  each primer,  $1,5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ , 1X buffer,  $0,2\text{mM}$  each DNTP and 2U of Taq DNA polymerase. The PCR program consisted of an initial denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation ( $94^{\circ}\text{C}$  for 1 min), annealing ( $57^{\circ}\text{C}$  for 1 min), and extension ( $72^{\circ}\text{C}$  for 1,5 min), with a final extension step at  $72^{\circ}\text{C}$  for 7 min. An Veriti thermal cycler Applied Biosystems was used for PCR (16).

PCR products was purified with EXOSAP-IT® enzyme USB and were sequenced using ABI 3500 GeneticAnalyzer with 50 cm capillaries and POP7 polymer (Applied

Biosystems). PCR products were labeled with 3.2 pmol of the same primer of reaction and 1  $\mu$ L of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in a final volume of 10  $\mu$ L. Labeling reactions were performed in a Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) thermocycler with a initial denaturing step of 96°C for 1 min followed by 35 cycles of 96°C for 15 sec, 50°C for 15 sec and 60°C for 4 min. Labeled samples were purified using BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) and electroinjected in the automatic sequencer.

**Multiplex PCR gyrB gene.** The isolates were submitted to gyrB multiplex PCR method as described by Higgins et. al. with few modifications. We used seven primers, in a total reaction volume of 25 $\mu$ L consisting of 0,2 $\mu$ M each primer, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1X buffer, 0,2mM each DNTP and 1U of Taq DNA polymerase. The PCR program consisted of an initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 30 cycles of denaturation (94°C for 1 min), annealing (56°C for 30 seconds), and extension (72°C for 1 min), with a final extension step at 72°C for 10 min an Veriti thermal cycler Aplied Biosystems. PCR products were analysed on agarose 1.5% w/ v gels, stained with ethidium bromide, and visualised on a UV transilluminator (17).

**The Minimal Inhibitory Concentration (MIC).** MIC was evaluated for Imipenem, Polymyxin B and Tigecycline and was determined by broth microdilution according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) was used for breakpoints of Tigecycline. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were used as quality control.

## Results

Most (106/118 -89.8%) isolates proved to be *A. baumannii*. Twelve (11.2%) non-*A. baumannii* isolates were identified: 6 (5.1%) *A. nosocomialis*, 5 (4.2%) were *A. pittii* and 1 (0.8%) *A. genomic specie* 10 were identified using the multiplex PCR for gyrB gene. All results were confirmed by the amplification and sequencing of 16S-23S rRNA gene spacer (ITS).



Most of *A. baumannii* (78 isolates - 73.5%) proved to be non-susceptible to imipenem. Three out of 6 isolates of *A. nosocomialis* were also resistant to imipenem but only one *A. pittii* was resistant to this carbapenem. Resistance to Polymyxin B was negligible among *A. baumannii* and all non-*A.baumannii* were susceptible to this antibiotic. The MIC<sub>90</sub> of tigecycline was 2 and 1 for *A. baumannii* and non-*A. baumannii*, respectively. (Table 1).

## Discussion

Currently, 23 species of *Acinetobacter* sp. present valid names. Four of these species are very similar considering either phenotypic or genotypic characteristics and are termed ABC. Phenotypic methodologies to differentiate the species of ABC complex have already been described but are very laborious for laboratorial routine. In this regard, methods based in the DNA analysis may be considered as an rapid alternative. DNA sequencing, however, requires sophisticated technologies that, usually, are restrict a reference laboratories (4, 5).

This work used two methods based in DNA analysis, a conventional multiplex PCR using seven primers targeting the *gyrB* and a sequencing of the ITS region. The results obtained demonstrated that the two methods presented 100% of concordance. Although the sequencing of the ITS could be considered a gold-standard for species differentiation, the multiplex PCR of the *gyrB* is a more feasible method to be used in the laboratory routine . According to our experience, the multiplex PCR for the *gyrB* could be performed in nearly three hours and required less sophisticated equipment and analysis of the results. This technique proved to be able to identify all but species of ABC in accordance to ITS sequencing. The only one isolate which was not identified in the multiplex PCR for *gyrB* gene when was analyze by sequencing ITS and proved to be *A. genospecie 10*, a specie that does not belong to the ABC. Therefore the multiplex PCR for the *gyrB* proved to be very efficient to identify the ABC species although it may not be able to identify all *Acinetobacter* sp.

We found high levels of carbapenem-resistance among the isolates of the *A.baumannii* in agreement with the resultados of recent studies realized in Latin America and southern Brazil. Comparing the resistance to antimicrobials tested in species of ABC complex, *A. baumannii* presented the highest levels of carbapenem-resistance but it is of note that 3 out of 6 of *A. nosocomialis* also presented resistance to imipenem.. These findings are similar to

those described in China, Korea and Singapore underscoring the potential clinical significance in these species (9, 10, 18, 21).

On the other hand we found high levels of susceptibility to Polymyxin B and low MICs of tigecycline in all species from ABC complex. These antibiotics can be considered options for patients that are infected or colonized with ABC isolates resistant to the carbapenems (19-22).

In conclusion, the multiplex PCR for the *gyrB* proved to be an effective method to identify the species of ABC. As this is a simpler methodology it could contribute to a better understanding of the epidemiology and clinical significance of the ABC species. Despite this the sequencing of ITS region is the preferred technique to be used to identify no prevalent species, such as *A. genospecie 10*.

### Acknowledgments

This study has received financial support from “Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre”.

### References

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21(3):538-82.
2. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). J Bacteriol. 1968;95(5):1520-41.
3. Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. Ann Inst Pasteur Microbiol. 1987;138(5):569-78.
4. Nemeč A, Krizová L, Maixnerová M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly

- Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol. 2011;162(4):393-404.
5. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol. 1991;29(2):277-82.
  6. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 2007;5(12):939-51.
  7. Montefour K, Frieden J, Hurst S, Helmich C, Headley D, Martin M, et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. Crit Care Nurse. 2008;28(1):15-25; quiz 6.
  8. Lee YC, Huang YT, Tan CK, Kuo YW, Liao CH, Lee PI, et al. *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13TU and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. J Antimicrob Chemother. 2011;66(8):1839-46.
  9. Lee YT, Kuo SC, Chiang MC, Yang SP, Chen CP, Chen TL, et al. Emergence of carbapenem-resistant non-*baumannii* species of *Acinetobacter* harboring a bla<sub>OXA-51</sub>-like gene that is intrinsic to *A. baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(2):1124-7.
  10. Kim DH, Choi JY, Jung SI, Thamlikitkul V, Song JH, Ko KS. AbaR4-type resistance island including the bla<sub>OXA-23</sub> gene in *Acinetobacter nosocomialis* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(8):4548-9.
  11. Wisplinghoff H, Edmond MB, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP, Seifert H. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis. 2000;31(3):690-7.
  12. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. J Clin Microbiol. 1995;33(1):11-5.
  13. Ehrenstein B, Bernardis AT, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner KJ, Bouvet PJ, et al. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. J Clin Microbiol. 1996;34(10):2414-20.

14. La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol.* 2006;44(3):827-32.
15. Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology.* 2009;155(Pt 7):2333-41.
16. Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1632-9.
17. Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H. *gyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4592-4.
18. Koh TH, Tan TT, Khoo CT, Ng SY, Tan TY, Hsu LY, et al. *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species in clinical specimens in Singapore. *Epidemiol Infect.* 2012;140(3):535-8.
19. Ferreira AE, Marchetti DP, da Cunha GR, de Oliveira LM, Fuentefria DB, Dall Bello AG, et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter sp.* from hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(6):725-30.
20. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(4):354-60.
21. Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL, Force C-PST. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control.* 2012;40(2):108-12.

22. Unal S, Garcia-Rodriguez JA. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* isolated in the MYSTIC Program, 2002-2004. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;53(4):265-71.

Table 1. Susceptible profile of species ABC complex

Specie (n) <sup>*</sup>	Imipenem <sup>a,b</sup>			Polymyxin B <sup>a,b</sup>		Tigecycline	
	S	I	R	S	R	MIC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIC <sub>90</sub> (µg/mL)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (106)	28	1	77	98	8	1	2
<i>Acinetobacter pittii</i> (5)	4	0	1	5	0	0,25	0,5
<i>Acinetobacter nosocomialis</i> (6)	3	0	3	6	0	0,25	1
<i>Acinetobacter genospecie 10</i> (1)	1	0	0	1	0	0,125	0,125

<sup>\*</sup> No was found any isolate of *Acinetobacter calcoaceticus* specie

<sup>a</sup> Number of isolates

<sup>b</sup> Breakpoints to Imipenem according to Clinical and Laboratory Standards Institute (2012): Resistant (R)  $\geq 16$  µg/mL; Intermediate (I) 8 µg/mL; and Susceptible (S)  $\leq 4$  µg/mL.

<sup>c</sup> Breakpoints to Polimyxin B according to Clinical and Laboratory Standards Institute (2012): Resistant (R)  $\geq 4$  µg/mL and Susceptible (S)  $\leq 2$  µg/mL.

**8. ARTIGO 2 EM INGLÊS ( short form paper submitted to Journal of Clinical Microbiology)**

Carbapenem-resistant *Acinetobacter nosocomialis* harboring IS*Aba1*-*bla*<sub>OXA-23</sub> genes: first report in Latin America

Running title: Carbapenem-resistant *A. nosocomialis* in Latin America

Aline Borges Teixeira,<sup>1</sup> Andreza Francisco Martins,<sup>2</sup> Juliana Barin,<sup>1</sup> Djuli Milene Hermes,<sup>1</sup>  
Caroline Pormann,<sup>3</sup> Afonso Luis Barth<sup>1,3,4#</sup>

Address of the institution at which the work was performed: Laboratório de Doenças Auto Imunes e Infeciosas, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Av. Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Vigilância em Saúde, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup> Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

#Corresponding author: Afonso Luis Barth, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. [albarth@hcpa.ufrgs.br](mailto:albarth@hcpa.ufrgs.br)

**Abstract:** In recent years, different resistance genes have been found in *Acinetobacter* spp., especially in the species *A. baumannii*. We describe two isolates of carbapenem-resistant *A. nosocomialis* harboring IS*Aba1*-*bla*<sub>OXA-23</sub> and *bla*<sub>OXA-51</sub> found in patients from the city of Porto Alegre, southern Brazil. To the best of the authors' knowledge, this is the first report of carbapenem-resistant *A. nosocomialis* in Latin America.

In recent years, *Acinetobacter* spp. have been described as important pathogens in outbreaks of nosocomial infection worldwide, especially in intensive care units.<sup>1</sup> In particular, the species *A. baumannii* has presented an increased rate of antimicrobial resistance.<sup>2,3</sup> Carbapenems, once regarded as the treatment of choice for infections caused by *Acinetobacter* spp., are no longer effective in some cases<sup>2</sup>. The main mechanism of carbapenem resistance among *Acinetobacter* spp. is the production of  $\beta$ -lactamases, in particular class D  $\beta$ -lactamases (oxacilinases), associated with promoter gene sequence IS*Aba*1.<sup>3</sup> Among oxacilinases, the most prevalent one is *bla*<sub>OXA-23</sub>, identified in mobile genetic elements. Chromosomally located *bla*<sub>OXA-51</sub> genes, in turn, do not always confer carbapenem resistance but are used to identify *A. baumannii*, as it is believed to be intrinsic to this species.<sup>4-6</sup>

Traditionally, the *bla*<sub>OXA-23</sub> and *bla*<sub>OXA-51</sub> genes are associated with *A. baumannii* only, but recently some authors have described the presence of such genes also in non-*A. baumannii* species. The *bla*<sub>OXA-23</sub> gene was found in *A. pittii* (*Acinetobacter* genomic species 3) in the Irish Republic in 2006, and in *A. nosocomialis* (*A.* genomic species 13TU) in South Korea and Thailand in 2012.<sup>7,8</sup> Moreover, *bla*<sub>OXA-51</sub> preceded by IS*Aba*1 has been found in carbapenem-resistant *A. nosocomialis* in Taiwan.<sup>9</sup>

In this study, we evaluated a set of non-*A. baumannii* species and found two isolates of carbapenem-resistant *A. nosocomialis* with IS*Aba*1-*bla*<sub>OXA-23</sub> and *bla*<sub>OXA-51</sub> genes, obtained from patients living in the city of Porto Alegre, southern Brazil.

A total of 118 isolates were evaluated, obtained over the year 2011 from clinical specimens of *Acinetobacter* spp. previously identified using conventional methods. Isolates were identified to species level using *gyrB* multiplex PCR as described by Higgins et al., with few modifications.<sup>10</sup> Briefly, we used seven primers at a total reaction volume of 25 $\mu$ L, consisting of 0.2 $\mu$ M each primer, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1X 0.2mM each DNTP, and 1U Taq DNA polymerase. The PCR program consisted of initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 30 cycles of denaturation (94°C for 1 min), annealing (56°C for 30 seconds), and extension (72°C for 1 min), with a final extension step at 72°C for 10 min. Species identification was also evaluated by PCR with primers targeting the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer (ITS) region followed by sequence analysis.<sup>11</sup> Oxacilinase genes (*bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, and *bla*<sub>OXA-143</sub>) were identified using multiplex PCR with specific primers. Isolates testing positive for oxacilinase genes were subjected to a PCR program for the promoter sequence IS*Aba*1.<sup>10, 12, 13</sup>



Imipenem and meropenem MICs were determined in duplicate using the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method.<sup>14</sup> *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were used as controls.

A total of 106 (89.8%) isolates proved to be *A. baumannii*. Twelve non-*A. baumannii* isolates were identified: 6 (5.1%) *A. nosocomialis*, 5 (4.2%) *A. pittii*, and 1 (0.8%) *Acinetobacter* genomic species 10 with 100% of concordance in two PCR methods tested to species for the *A. baumannii-calcoaceticus* complex. The *bla*<sub>OXA-51</sub> and *bla*<sub>OXA-23</sub> genes were identified in 5 (4.3%) and 4 (3.4%) isolates of non-*A. baumannii*, respectively. Of the five isolates that tested positive for *bla*<sub>OXA-51</sub>, four were *A. nosocomialis* and one was *A. pittii*. Among the four isolates positive for *bla*<sub>OXA-23</sub>, three were *A. nosocomialis* and one was *A. pittii*. No other oxacilinases were found. For the first time in Latin America, IS*Aba1* upstream *bla*<sub>OXA-51</sub> and *bla*<sub>OXA-23</sub> genes was identified in two isolates of carbapenem-resistant *A. nosocomialis* (Table 1). The presence of oxacilinase genes in non-*A. baumannii* had already been described in studies from China, Korea, and Singapore, which underscores the potential clinical significance of these species.<sup>7-9,15</sup>

It is worthy of note that two isolates of carbapenem-susceptible *A. nosocomialis* and one of *A. pittii* were found to harbor *bla*<sub>OXA-23</sub>. Notwithstanding, these isolates did not present the IS*Aba1* upstream the oxacilinase genes. It is well established that the promoter sequence IS*Aba1* has to be present to ensure oxacilinase expression and consequently the development of resistance. We also found that resistance to carbapenems was not necessarily related to oxacilinase genes, as one *A. nosocomialis* and one *A. pittii* resistant to carbapenems did not present these genes. In fact, it has already been shown that carbapenem resistance may be mediated by other mechanisms, e.g., porin loss and hyperexpression of efflux pumps.<sup>2</sup>

Several studies have identified a variety of oxacilinases in carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates. The main oxacilinases described include the *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, and *bla*<sub>OXA-143</sub>; *bla*<sub>OXA-51</sub> is believed to be intrinsic to *A. baumannii*, whereas the two latter have been associated with carbapenem resistance.<sup>16-20</sup>

In this study, we found two isolates of *A. nosocomialis* harboring the IS*Aba1* upstream *bla*<sub>OXA-23</sub> and *bla*<sub>OXA-51</sub>, which has proved to confer resistance to carbapenems. These findings reinforce the importance of species level identification, as there may be horizontal transfer of oxacilinase genes among different species of *Acinetobacter* genus, a phenomenon previously described by Poirel et al.<sup>21</sup> In fact, non-*A. baumannii* species cannot be considered

homogeneously susceptible to carbapenems, and may in fact lead to an increased prevalence of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp.

To the best of our knowledge, this is the first study reporting the identification of oxacilinase genes in non-*A. baumannii* isolates in Latin America.

### Acknowledgments

This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), by Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### References

1. **Bergogne-Bérézin E, Towner KJ.** 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 9(2):148-165.
2. **Peleg AY, Seifert H, Paterson DL.** 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 21(3):538-582.
3. **Poirel L, Nordmann P.** 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 12(9):826-836.
4. **Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK.** 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 44(1):196-199.
5. **Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL.** 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol. 44(8):2974-2976.
6. **Walther-Rasmussen J, Hoiby N.** 2006. OXA-type carbapenemases. J Antimicrob Chemother. 57(3):373-383.
7. **Boo TW, Walsh F, Crowley B.** 2006. First report of OXA-23 carbapenemase in clinical isolates of *Acinetobacter* species in the Irish Republic. J Antimicrob Chemother. 58(5):1101-1102.

8. **Kim DH, Choi JY, Jung SI, Thamlikitkul V, Song JH, Ko KS.** 2012. AbaR4-type resistance island including the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene in *Acinetobacter nosocomialis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(8):4548-4549.
9. **Lee YT, Kuo SC, Chiang MC, Yang SP, Chen CP, Chen TL, Fung CP.** 2012. Emergence of carbapenem-resistant non-*baumannii* species of *Acinetobacter* harboring a *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene that is intrinsic to *A. baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(2):1124-1127.
10. **Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H.** 2010. *gyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *J Clin Microbiol.* 48(12):4592-4594.
11. **Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC.** 2005. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol.* 43(4):1632-1639.
12. **Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SGB, Livermore DM.** 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *Int J Antimicrob Agents.* 27(4):351-353.
13. **Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL.** 2006. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett.* 258(1):72-77.
14. **CLSI.** 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
15. **Pagano M, Martins AF, Machado AB, Barin J, Barth AL.** 2012. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the *ISAbal* upstream *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gene in Porto Alegre, southern Brazil. *Epidemiol Infect.* 141: 1-4.
16. **Coelho JM, Turton JF, Shah-Afzal M, Livermore DM.** 2006. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter spp.* collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(2):756-758.

17. **Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro M, Stier C, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Penteado-Filho SR, Livermore DM, Woodford M.** 2003. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol.* 41(7):3403-3406.
18. **Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS.** 2012. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 73(4):354-360.
19. **Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF.** 2012. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents.* 39(5):396-401.
20. **Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC, America SPGL.** 2004. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis.* 8(1):25-79.
21. **Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P.** 2008. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter spp.* *Antimicrob Agents Chemother.* 52(4):1252-6.

TABLE 1. Characteristics of non-*Acinetobacter baumannii* isolates

Species <sup>a</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	IS <i>Aba</i> 1 upstream <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	IS <i>Aba</i> 1 upstream <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	Imipenem ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>b</sup>	Meropenem ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>b</sup>
<i>A. pittii</i> <sup>c</sup>	-	-	-	-	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$
<i>A. nosocomialis</i> <sup>d</sup>	-	-	-	-	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$
<i>A. pittii</i>	-	-	-	-	$\geq 256$	64
<i>A. pittii</i>	-	-	-	-	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$
<i>A. genospecies 10</i>	-	-	-	-	1	2
<i>A. nosocomialis</i>	+	+	+	+	128	64
<i>A. nosocomialis</i>	+	+	+	+	64	64
<i>A. nosocomialis</i>	-	-	-	-	64	64
<i>A. pittii</i>	+	+	-	-	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$
<i>A. nosocomialis</i>	+	-	-	-	1	$\leq 0.5$
<i>A. nosocomialis</i>	+	+	-	-	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$
<i>A. pittii</i>	-	-	-	-	$\leq 0.5$	$\leq 0.5$

<sup>a</sup> All isolates were identified using *gyrB* multiplex PCR and confirmed by 16S-23S intergenic transcribed spacer sequence analysis.

<sup>b</sup> MIC breakpoints for two carbapenems according to the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method: resistant  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$ ; intermediate 8  $\mu\text{g/mL}$ ; and susceptible  $\leq 4$   $\mu\text{g/mL}$ .

<sup>c</sup> Formerly *Acinetobacter* genomic species 3.

<sup>d</sup> Formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o gênero *Acinetobacter* tenha sido descrito há mais de 50 anos, atualmente este gênero tem aumentado em sua importância como causador de infecção em pacientes hospitalizados. Além disso, a resistência aos antibióticos, em particular os carbapenêmicos, é um dos principais problemas para o tratamento de infecções por isolados deste gênero. Apesar de possuir uma espécie bem conhecida, *A. baumannii*, o gênero demonstra-se heterogêneo com espécies nosocomiais e do ambiente. Atualmente, 23 espécies já foram denominadas e 9 genoespécies já foram descritas.

Nesse sentido, existem nesse gênero 4 espécies muito semelhantes genotipicamente e fenotipicamente porém com contextos clínicos e epidemiológicos distintos que foram agrupados em um complexo denominado *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*. Devido à dificuldade na distinção das espécies do complexo através de métodos convencionais e rápidos pouco se sabe sobre o atual contexto das espécies do complexo ABC. No entanto, sabe-se que a espécie a qual apresenta alta taxa de resistência aos carbapenêmicos e que possui a maior prevalência é a *A. baumannii*.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar um método rápido e de baixo custo para a identificação do complexo ABC, compará-lo aos resultados do sequenciamento do 16S-23S, atualmente considerado o padrão ouro e avaliar a prevalência e a susceptibilidade aos antimicrobianos das espécies desse grupo.

Valendo-se disso, nosso estudo confirmou que o Multiplex PCR para o gene *gyrB* é uma metodologia rápida, simples e específica para a identificação das espécies do Complexo ABC. Os resultados deste estudo confirmaram a alta prevalência da espécie *A. baumannii* bem como a sua alta taxa de resistência ao carbapenêmico testado, imipenem. No entanto, foi demonstrado que a resistência aos carbapenêmicos pode ser encontrada entre espécies de non-*A. baumannii*, em particular a espécie *A. nosocomialis* apesar do número pequeno de amostras analisadas. Por outro lado, nosso estudo encontrou altas taxas de sensibilidade ao antimicrobianos Polimixina B e Tigeciclina, conformando que os mesmos podem ser utilizados como opção terapêutica para infecções por ACB resistentes aos carbapenêmicos.

As espécies do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* também foram testadas para os genes das oxacilinases, onde encontramos dos doze isolados não-*baumanni* analisados, 4 positivos para o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> e três isolados positivos para o gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, sendo dois desses isolados resistentes aos carbapenêmicos, o que indica que pode existir transferência horizontal das oxacilinases entre as espécies de ABC.

Então, destaca-se a importância do estudo de métodos rápidos e exequíveis em laboratórios de rotina para a identificação das espécies do complexo ABC visto que nosso trabalho, assim como trabalhos em Singapura, China e Coreia encontram espécies não-*A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos e que apresentam elementos genéticos móveis como as oxacilinases.