

1 INTRODUÇÃO

As bactérias gram-negativas não-fermentadoras estão amplamente distribuídas no meio ambiente e são causa crescente de infecções sérias em hospitais, onde afetam principalmente pacientes imunocomprometidos por doenças de base ou por tratamentos médicos e procedimentos cirúrgicos. Muitas espécies são conhecidas pela sua resistência a todas as classes de antimicrobianos e pela facilidade com a qual podem adquirir novos mecanismos de resistência (ENOCH; BIRKETT; LUDLAM, 2007).

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) é um cocobacilo gram-negativo, não fermentador de glicose, imóvel, oxidase negativa, cujo reservatório natural ainda está sendo determinado. Contudo está amplamente distribuído no ambiente hospitalar, sendo muito eficaz em colonizar seres humanos. A combinação de apresentar uma longa permanência no meio ambiente e uma ampla série de determinantes de resistência o torna um patógeno nosocomial bem sucedido.

A. baumannii é considerado causa emergente de inúmeros surtos pelo mundo, com índices de resistência em elevação. Há relatos de *A. baumannii* multirresistente em hospitais na Europa, América do Norte, Argentina, Brasil, China, Taiwan, Hong Kong, Japão, Coréia e Taiti. O termo multirresistente (MR) para *Acinetobacter* spp. não possui ainda uma definição padrão, sendo geralmente empregado na caracterização de isolados resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos usados no tratamento de infecções por *Acinetobacter* spp. O termo pan-resistente tem sido usado para descrever isolados resistentes a todas as classes de antimicrobianos, exceto colistina (PEREZ *et al.*, 2007; MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008).

As infecções por *A. baumannii* MR tendem a ser oportunistas, ocorrendo em pacientes imunossuprimidos, com doenças graves, ou que tenham sido submetidos a procedimentos invasivos ou tratados com antimicrobianos de amplo espectro. Ocorrem frequentemente em pacientes de unidades de terapia intensiva (UTI), onde causam pneumonia associada ao uso de ventilação mecânica (VAP), bacteriemia ou infecção do trato urinário. Infecções como meningite secundária, infecções em feridas cirúrgicas, tecidos e abdomen são menos freqüentes (ZARILLI *et al.*, 2004).

Infecções nosocomiais causadas por *A. baumannii* são difíceis de tratar devido à resistência a múltiplos antimicrobianos e estão associadas a um aumento

significativo de mortalidade. O uso extensivo de antimicrobianos dentro dos hospitais tem contribuído para a emergência e aumento do número de isolados de *A. baumannii* resistentes a uma grande variedade de antimicrobianos incluindo beta-lactâmicos de amplo espectro, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Enquanto os carbapenêmicos ainda são as drogas de escolha, a resistência a eles já se tornou comum, restando poucas opções terapêuticas, entre elas a polimixina e a colistina (ZARILLI *et al.*, 2004; TURTON *et al.*, 2005).

Os mecanismos de resistência freqüentemente expressos em infecções nosocomiais por *A. baumannii* incluem a produção de β -lactamases, alterações nas porinas e bombas de efluxo. Os mais relevantes são decorrentes da produção de β -lactamases adquiridas, incluindo serina e metalo- β -lactamases, as quais conferem resistência aos carbapenêmicos (BONOMO; SZABO, 2006).

Pesquisas de possíveis fontes de surtos causados por *A. baumannii* baseiam-se principalmente em métodos de tipagem epidemiológica como eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE), avaliação dos fatores de risco para a aquisição de cepas epidêmicas e pesquisa dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos. A análise epidemiológica das infecções nosocomiais causadas por *A. baumannii* visa auxiliar no desenvolvimento de medidas racionais para controlar a disseminação do microrganismo (KOELEMAN, 2001).

Em Curitiba, no final da década de 90, houve o relato dos oito primeiros casos de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos isolados de pacientes do Hospital de Clínicas e do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. Os isolados de *A. baumannii* MR eram produtores de oxacilinase OXA-23 e pertenciam a um mesmo clone (DALLA-COSTA *et al.*, 2003).

Posteriormente, observou-se a crescente prevalência das amostras de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos e produtoras de OXA-23 isoladas no HC-UFPR, fato que motivou o presente trabalho no intuito de verificar a ocorrência da disseminação clonal de *A. baumannii* entre os pacientes do hospital.

1.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil genotípico de amostras de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes isoladas de pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC- UFPR) no período de outubro de 2002 a maio de 2005.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil dos isolados de *A. baumannii* pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE);
- Avaliar métodos fenotípicos para a pesquisa de metalo- β -lactamases (M β L);
- Aplicar a técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisar os principais genes que codificam M β L;
- Avaliar o perfil de suscetibilidade ao antimicrobiano Tigeciclina através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e método de disco difusão, como alternativa terapêutica no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* MR;
- Avaliar o método de disco difusão em comparação à diluição em ágar para determinação da suscetibilidade do antimicrobiano Ampicilina-sulbactam utilizado na prática clínica para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O MICRORGANISMO

O conceito original do gênero *Acinetobacter* incluía uma coleção heterogênea de cocobacilos gram-negativos, imóveis, oxidase positiva ou negativa, sapróbios, que podiam ser diferenciados de outras bactérias com estas características pela ausência de pigmentação das colônias. Estudos nutricionais mostraram claramente que linhagens oxidase negativa diferiam das oxidase positiva, e a partir de 1971 recomendou-se que o gênero *Acinetobacter* compreendesse apenas linhagens oxidase negativa (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996).

Bactérias classificadas como membros do gênero *Acinetobacter* passaram por uma longa história de mudanças taxonômicas. Por isso, receberam várias denominações, sendo que entre as mais conhecidas estão *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Micrococcus calcoaceticus* e *Moraxella lwoffii*. Ainda hoje, entretanto, a proposta taxonômica para estes microrganismos e o delineamento das espécies pertencentes ao gênero são objetos de estudos.

O gênero *Acinetobacter*, atualmente classificado na família *Moraxellaceae* compreende cocobacilos gram-negativos, não-fermentadores de glicose, estritamente aeróbicos, imóveis, catalase positiva e oxidase negativa, apresentando as melhores taxas de crescimento entre 20 e 30°C, sem requerimento de fatores de crescimento e raramente reduzindo o nitrato (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; BOUVET e GRIMONT, 1986).

A diversidade do gênero *Acinetobacter* é observada pela variedade de grupos fenotípicos e de grupos de DNA homólogos que têm sido definidos. Em razão de critérios insuficientes para a identificação, porém, costumava-se considerar os membros do gênero como pertencentes a uma única espécie, *Acinetobacter calcoaceticus*.

Usando hibridização de DNA, Bouvet e Grimont (1986) propuseram 12 grupos diferentes (genomoespécies) dentro do gênero *Acinetobacter*, os quais podiam ser diferenciados por vinte e oito testes fenotípicos. Quatro novas espécies *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii* e *Acinetobacter junii* foram propostas e as espécies *Acinetobacter calcoaceticus* e

Acinetobacter lwoffii foram redescritas (GERNER-SMIDT; TJERNBERG; URSING, 1991). Atualmente existem pelo menos 25 genomoespécies descritas dentro do gênero *Acinetobacter* (WINN *et al.*, 2006).

Os testes para identificação de *Acinetobacter* spp. selecionados por Bouvet *et al.* (1986, 1989), parecem ser apropriados, mas a realização do amplo painel de testes fenotípicos é trabalhosa e demorada. Esquemas de identificação simples tais como os de Tjernberg e Ursing (1990) e Gerner-Smidt *et al.* (1991), acrescentados aos testes de suscetibilidade antimicrobiana, podem ser úteis para laboratórios com recursos limitados e podem ser adaptados para identificar os isolados clínicos, evitando-se, deste modo, o uso de metodologia molecular em laboratórios que não possuem a infra-estrutura necessária implementada (PRASHANTH; BADRINATH, 2000).

A identificação do gênero *Acinetobacter* pode ser iniciada pela sua morfologia observada pelo método de Gram, onde as células bacterianas aparecem na forma de cocobacilos gram-negativos sempre dispostos como diplococos, similar a *Neisseria* spp. Após 24 h de incubação em ágar sangue as colônias possuem entre 0,5 e 2 mm de diâmetro, são opacas ou translúcidas e convexas. A maioria das espécies cresce bem no ágar MacConkey, produzindo uma fraca coloração rosa, devido à oxidação fraca da lactose. As provas presuntivas para a identificação das espécies do gênero *Acinetobacter* incluem a ausência de citocromo-oxidase, motilidade negativa e resistência à penicilina. *A. baumannii* é sacarolítico e acidifica a maioria dos carboidratos no meio de oxidação e fermentação (OF), sendo identificado pela produção de ácido a partir da glicose (WINN *et al.*, 2006).

Apesar dos dados clínicos e epidemiológicos consideráveis em relação ao papel do *A. baumannii* em infecções nosocomiais, os fatores de virulência específicos e mecanismos de patogenicidade do microrganismo ainda não foram elucidados.

A proteína de membrana externa 38 (Omp38) pode agir como potencial fator de virulência na indução da apoptose de células epiteliais no estágio inicial da infecção por *A. baumannii* (CHOI *et al.*, 2005).

Nenhum fator de aderência específico, como fímbrias, tem sido descrito em *Acinetobacter* e sabe-se que o microrganismo é capaz de crescer sob condições de deficiência de ferro, sugerindo a presença de sideróforo. A bactéria é capaz de

expressar grande afinidade por sistemas de captação de ferro compostos por sideróforos (CHOI *et al.*, 2005; JOLY-GUILLOU, 2005).

Os lipopolissacarídeos (LPS) estão envolvidos na resistência ao complemento do soro humano e agem em sinergismo com a cápsula exopolissacarídica. O complemento exerce papel na atividade bactericida do soro humano. A cápsula polissacarídica bloqueia o acesso do complemento à parede celular bacteriana e previne a ativação, por caminhos alternativos, do complemento, como foi demonstrado em modelos experimentais de infecções por gram-negativos. A produção de exopolissacarídeo por uma bactéria patogênica é o principal fator de virulência e sabe-se que protege a bactéria das defesas do hospedeiro (JOLY-GUILLOU, 2005).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

As espécies do gênero *Acinetobacter* são sapróbios de vida livre que podem ser facilmente isoladas do solo, água e alimentos. Também podem ser encontradas no ambiente hospitalar, onde podem ser isoladas como comensais na pele de profissionais da saúde e de pacientes. Alguns membros do gênero são reconhecidos como patógenos nosocomiais que têm papel relevante na colonização e infecção de pacientes admitidos em hospitais (TOWNER, 1997).

Acinetobacter spp. têm sido freqüentemente relatados como agentes causadores de surtos em hospitais. As circunstâncias de alguns surtos demonstram a sobrevivência longa do *Acinetobacter* em ambientes secos e inanimados (WENDT *et al.*, 1997). *A. baumannii* sobrevive melhor à dessecação do que outras espécies como *A. johnsonii*, *A. junii* e *A. lwoffii*, as quais raramente têm sido relatadas em surtos. A resistência a condições ambientais adversas como a dessecação é uma propriedade que pode aumentar a transmissibilidade e ser característica das amostras de surtos, o que as distingue das não relacionadas a surtos (JAWAD *et al.*, 1998).

Estudos têm demonstrado que pacientes infectados e/ou colonizados podem ser os reservatórios de *A. baumannii* MR, e que a principal via de transmissão ocorre pelas mãos dos profissionais de saúde (del MAR TOMAS *et al.*, 2005).

Os níveis de colonização na pele de profissionais da saúde em ambulatórios são elevados (25 a 40%), chegando a 75% nos pacientes hospitalizados. A bactéria

coloniza a faringe em 7% da população geral, podendo ser também isolada de escarro, urina, fezes e secreções vaginais (MARCHAIM *et al.*, 2007).

Embora *A. baumannii* não seja considerado habitante do trato digestivo de pessoas saudáveis, em pacientes hospitalizados com doenças graves a microbiota normal do intestino pode ser modificada, sendo reportadas elevadas taxas de portadores intestinais em pacientes de UTI (CORBELLA *et al.*, 1996). A taxa de portadores intestinais de *A. baumannii* na comunidade é de 0,8% enquanto em pacientes hospitalizados atinge 41% (DIJKSHOORN *et al.*, 2005).

A utilização de equipamentos médicos não completamente descontaminados na manutenção de pacientes severamente doentes, tais como ventiladores, respiradores, e monitores de pressão arterial, tem sido implicada na transmissão de *A. baumannii* aos pacientes. *Acinetobacter* também tem sido encontrado em colchões, travesseiros, aparelhos de televisão e ventiladores, os quais podem servir de fômites durante os surtos (JAWAD *et al.*, 1998).

A incidência de pacientes colonizados ou infectados por *A. baumannii* em UTI passou de 6,3 casos / 100 admissões em 1992 para 14 casos / 100 admissões em 1996, tornando-se a causa mais comum de infecção em pacientes de UTI (CORBELLA *et al.*, 2000).

Segundo estudos de casos clínicos, observou-se que o uso prévio de antimicrobianos, entre eles carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração, é descrito como o principal fator de risco para aquisição de *A. baumannii* MR. O segundo fator de risco mais comum seria o uso de ventilação mecânica, seguido da permanência em UTI, bem como o período de permanência nesta. Na seqüência, a severidade da doença de base, intervenções terapêuticas, o uso de nutrição parenteral, transfusões, hidroterapia, cirurgias recentes, uso de cateteres e sondas de Foley são citados como fatores de risco (del MAR TOMAS *et al.*, 2005; FALAGAS; KOPTERIDES, 2006).

O tamanho do hospital (>500 leitos) não era descrito como fator de risco, mas provavelmente o aumento no número de leitos reflete a complexidade de pacientes admitidos, associado ao alto número de pacientes em situação de risco, e de profissionais da saúde. Desta forma, o consumo de antimicrobianos também é maior, e os surtos tornam-se mais difíceis de serem controlados (CISNEROS; BANÓ, 2005).

Estes fatores têm suscitado controvérsia. Na maioria dos estudos, os fatores de risco identificados estão de acordo com os associados a outras infecções nosocomiais, tais como severidade da doença, uso prévio de antimicrobiano, ou o número de dias com procedimento invasivo. Contudo, quando foi feita uma busca prospectiva de pacientes colonizados por sítios anatômicos, observou-se que uma grande proporção dos pacientes internados em UTI tornou-se secundariamente colonizada com *A. baumannii*, de modo similar ao que ocorre em pacientes colonizados ou infectados com outros patógenos nosocomiais. Este estado prévio de portador de *A. baumannii* foi a principal característica para o subsequente desenvolvimento de infecção. Sob circunstâncias epidemiológicas especiais, tais como as observadas em UTI, a prevenção inadequada da transmissão horizontal determina que o estado de portador ocorra muito cedo durante a admissão na UTI (CORBELLA *et al.*, 2000; STEPHENS *et al.*, 2007).

A epidemiologia da resistência bacteriana pode variar de maneira local, nacional e mundial. A maioria dos surtos envolve poucos pacientes, e a prevalência da resistência é freqüentemente mais elevada em unidades de terapia intensiva. O perfil de resistência pode variar de um país para outro ou de um continente para outro (LIVERMORE, 2003). A suscetibilidade de *A. baumannii* aos antimicrobianos varia consideravelmente entre os países, hospitais e até mesmo entre as unidades de um hospital, refletindo diferentes modelos de uso de antimicrobianos e situações epidemiológicas. Os diversos perfis de resistência dos isolados enfatizam a importância da vigilância local para determinar a terapia mais adequada para infecções por *A. baumannii* (CISNEROS; BAÑO, 2002).

A análise de surtos por *A. baumannii* mantém a idéia de que a transmissão para múltiplos pacientes pode ser aumentada por disseminação ambiental, o que torna necessária a implementação de medidas de controle de infecção (FALAGAS; KOPTERIDES, 2006).

Na última década *A. baumannii* MR tem sido relatado como o principal patógeno nosocomial em muitas partes do mundo, resultando em aumentos significativos da mortalidade, morbidade e de custos. A Reunião Internacional para o Estudo e Prevenção da Resistência Antimicrobiana Emergente definiu as infecções por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos como um evento de sentinela global, exigindo rápidas intervenções epidemiológicas e microbiológicas (MARCHAIM *et al.*, 2007). Numerosos relatos têm enfatizado a necessidade do uso

racional de antimicrobianos, melhora no controle de infecções, e o investimento no desenvolvimento de novas drogas. Entretanto, a redução no uso de antimicrobianos nem sempre leva a redução da resistência. Os programas de controle de resistência devem persistir com o objetivo de diminuir o desenvolvimento de novas resistências enquanto continua o desenvolvimento de novos agentes numa velocidade suficiente para manter-se à frente da bactéria (LIVERMORE, 2003).

Acinetobacter spp. já foi comparado a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA-Methicilin resistant *Staphylococcus aureus*), e tem sido denominado “MRSA gram-negativo”. Apesar do comportamento epidemiológico semelhante, seu impacto em termos de morbidade e mortalidade é mais próximo ao dos estafilococos coagulase negativa. Estima-se que a incidência de bacteriemia por *Acinetobacter* seja dez vezes menor do que por *S. aureus*. (JOLY-GUILLOU, 2005). Como *A. baumannii* pode sobreviver por longos períodos no ambiente hospitalar, têm-se sugerido que sejam adotadas medidas de controle de infecção semelhantes às adotadas para *Staphylococcus aureus* (MRSA) (TURTON et al., 2004). As medidas mais eficazes reportadas para reduzir a disseminação das infecções por *A. baumannii* MR nos hospitais são precauções de contato rigorosas, coorte, aplicação de rotinas de vigilância no sentido de identificar colonizadores, limpeza intensa no ambiente, gerenciamento apropriado das infecções e tentativas de descolonização, as quais possuem valor questionável (MARCHAIM et al., 2007).

2.3 PATOGENICIDADE

Antes de 1970 as infecções por *Acinetobacter* eram, em sua maioria, infecções urinárias pós-cirúrgicas, que ocorriam principalmente em pacientes de unidades cirúrgicas ou clínicas. Atualmente, o principal papel desta bactéria está relacionado a pneumonia nosocomial associada ao uso de procedimentos de ventilação mecânica, conforme o aumento na incidência de 0,64% para 6,4, observado entre 1976 e 1990 (JOLY-GUILLOU, 2005).

A. baumannii é um importante patógeno nosocomial oportunista, responsável por causar pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções do trato urinário, meningite secundária e bacteriemia (OTEO et al., 2007). As infecções por *A. baumannii* MR geralmente ocorrem em pacientes com doenças graves, internados em UTI, sendo elevada a mortalidade associada, atingindo níveis de 26 a

68%. A mortalidade associada por ser devido à resistência aos antimicrobianos, a ineficácia da terapia empírica e a disponibilidade de poucas opções terapêuticas (MARAGAKIS; PERL, 2008).

Dados publicados pelo *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS) em pacientes de UTI mostraram que, em 2003, *Acinetobacter* sp foi responsável por 6,9% das pneumonias, 2,4% das bacteriemias, 2,1% das infecções em sítios cirúrgicos e 1,6% das infecções urinárias, enquanto que *Pseudomonas* sp foi responsável por 18,1%, 3,4%, 9,5% e 16,3% destas infecções respectivamente. (FALAGAS; KOPTERIDES, 2006).

O prognóstico associado à pneumonia nosocomial causada por *Acinetobacter* spp. é consideravelmente pior do que ao associado a outras bactérias gram-negativas ou gram-positivas, com exceção de *Pseudomonas aeruginosa* (BERGOGNE-BÉRÉZIN e TOWNER, 1996).

Bacteriemia causada por *A. baumannii* é caracteristicamente uma infecção nosocomial oportunista, mais frequentemente adquirida em UTIs. Atinge predominantemente pacientes suscetíveis, que tenham sido submetidos previamente a procedimentos invasivos. Estes procedimentos incluem cateteres intravasculares, cateteres urinários, ventilação mecânica e cirurgia prévia. Alguns destes casos podem ser secundários a infecção por cateter intravascular não diagnosticada ou ter origem intestinal em decorrência da translocação bacteriana (CISNEROS e BANÕ, 2002). As manifestações clínicas são inespecíficas e acomete geralmente paciente acima dos 50 anos, do sexo masculino, sendo 54% internados em UTI (JOLY-GUILLOU, 2005).

Bacteriemia por *Acinetobacter* spp. já foi considerada de baixa severidade clínica; porém, há evidências contradizendo este ponto de vista, uma vez que pode frequentemente levar ao choque séptico (25-30%), além de ter um curso clínico fulminante, associado à mortalidade de 45% em pacientes com pneumonia comunitária (CISNEROS *et al.*, 1996).

A literatura também traz numerosos relatos de *Acinetobacter* spp. causando infecções na pele, feridas, abscessos, endocardites, peritonites e em feridas por queimaduras. Em infecções de ferida *Acinetobacter* raramente é o único microrganismo isolado. Geralmente as infecções de ferida são polimicrobianas, onde estão associadas outras bactérias gram-negativas e anaeróbias (TOWNER, 1997).

Infecções por *Acinetobacter* spp. têm sido freqüentemente reportadas em vítimas de traumas, mas não está claro se estas são devido a contaminação ambiental do local onde ocorreu o trauma, ou se foram adquiridas nos centros de atendimento onde estes pacientes foram tratados (TURTON *et al.*, 2006a).

A meningite por *A. baumannii* é uma infecção esporádica vista em unidades neurocirúrgicas após cirurgia ou trauma craniano. O microrganismo não é um patógeno comum em meningites e normalmente não atravessa a barreira hematoencefálica em pacientes saudáveis. Ocasionalmente ocasiona as alterações comuns de meningite bacteriana como glicose baixa, proteína elevada e leucócitos polimorfonucleares elevados. Porém, a semelhança morfo-tintorial com *Neisseria* spp. pelo método de Gram pode levar a diagnóstico errôneo, o qual deve ser evitado (TOWNER, 1997).

2.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência bacteriana aos antimicrobianos está aumentando de prevalência no mundo todo. Este acúmulo reflete o desenvolvimento de novos mecanismos de resistência, a transferência dos genes de resistência entre as bactérias e a propagação das linhagens resistentes entre os pacientes. A importância relativa destes fatores depende da combinação da espécie com os antimicrobianos, mas cada processo é determinado pela pressão seletiva do uso de antimicrobianos (LIVERMORE; WOODFORD, 2000).

Em decorrência de sua natureza sapróbia, *Acinetobacter* é um gênero que esteve exposto por longos períodos a organismos produtores de antimicrobianos no solo e por pressão seletiva pode justificar a capacidade do microrganismo de desenvolver resistência aos antimicrobianos de forma rápida. Este é um contraste em comparação a outras bactérias de importância clínica, que parecem requerer mais tempo para adquirir mecanismos de resistência efetivamente elevada (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996).

Foi demonstrado há mais de 25 anos que *Acinetobacter* spp. pode adquirir fatores de resistência aos antimicrobianos através de conjugação de plasmídeos. Atualmente sabe-se que os transposons são importantes para a disseminação de determinantes genéticos de resistência em *Acinetobacter* spp. Transposons são elementos genéticos que podem estar integrados no cromossomo ou ser carregados por plasmídeos, e muitos deles contêm integrons (predominantemente da classe 1).

Integrans são elementos genéticos incapazes de se locomoverem, por isso precisam ser carregados por transposons ou plasmídeos (PEREZ *et al.*, 2007).

Integrans são capazes de capturar genes por um mecanismo de recombinação sítio-específico que normalmente transporta genes cassetes com determinantes de resistência aos antimicrobianos. São divididos em classes com base na seqüência do gene da integrase. Embora pelo menos seis classes de integrans tenham sido descritas, a classe 1 é a mais comum entre os isolados clínicos de bactérias gram-negativas, incluindo *Acinetobacter*. Integrans da classe 2 têm sido raramente encontrados em espécies de *Acinetobacter* (TURTON *et al.*, 2005).

Os integrans de classe 1 são constituídos de uma região conservada 5', (5'-CS), formada por um gene *intI1*, uma região promotora e um sítio de recombinação (*attI1*) e uma região conservada 3' (3'-CS) (figura 1). Essa última região é geralmente composta do gene *qacEΔ1* conjugado ao gene *sul1*, sendo que esses genes codificam resistência a compostos de amônio quaternário e sulfonamidas, respectivamente. Na região *upstream* ao gene *intI1*, os integrans apresentam uma região promotora, a qual é responsável pela expressão dos cassetes gênicos inseridos entre as regiões conservadas 5' e 3'.

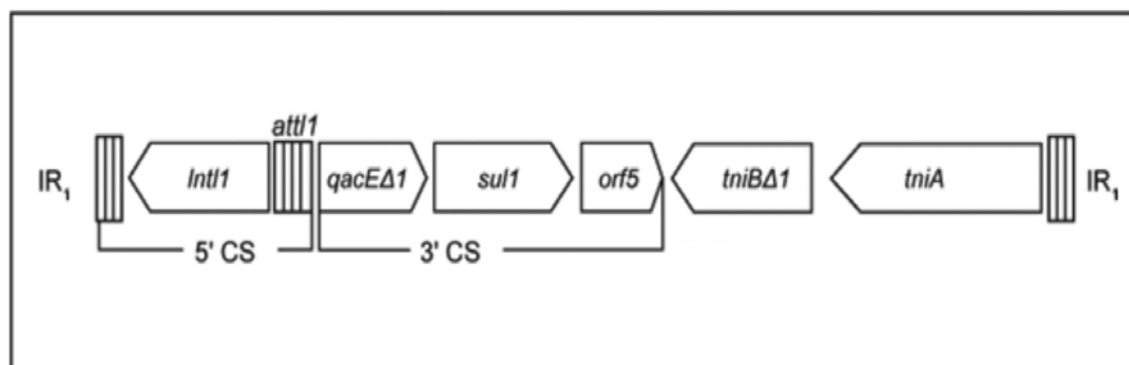


FIGURA 1 – ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DE INTEGRON DE CLASSE 1.
 FONTE: Mendes *et al.* (2006)

Cassetes gênicos têm normalmente entre 500 a 1.000 pares de bases e são constituídos por dois componentes funcionais: um gene, responsável pela codificação de alguma proteína, e um sítio de recombinação, conhecido como 59 elementos de base (59-be). Esses genes não possuem promotor, assim, o evento de

expressão gênica é dependente do promotor presente no integron no qual ele está inserido. Usualmente codificam resistência a antimicrobianos e desinfetantes.

A integrase, enzima codificada pelo *intI1* é uma recombinase sítio-específica e possui como substrato preferencial dois sítios de ação, um na porção do 59-be do cassete gênico, e outro no receptor do cassete gênico ou *attI1*, localizado no integron (MENDES *et al.*, 2006).

A seleção e disseminação dos elementos móveis carreando genes de resistência podem ser amplificadas no ambiente hospitalar pelo uso indiscriminado de antimicrobianos (PEREZ *et al.*, 2007).

A descrição de seqüências de inserção (ISs) que promovem a expressão gênica possuem também um importante papel na explicação da regulação da resistência. A presença do elemento IS_{Aba1}, o qual foi identificado em *A. baumannii* mas não em enterobactérias ou em *P. aeruginosa*, resulta no aumento da expressão da AmpC e beta-lactamases do tipo OXA51/OXA-69, e na diminuição dos níveis de suscetibilidade a ceftazidima e carbapenêmicos (PEREZ *et al.*, 2007).

Até o início dos anos 70, infecções nosocomiais por *A. baumannii* eram tratadas com sucesso com gentamicina, minociclina, ácido nalidíxico, ampicilina, ou carbenicilina, tanto sozinhos quanto combinados, mas taxas de resistência em elevação começaram a ser divulgadas entre 1971 e 1974. Desde 1975, surtos sucessivos têm demonstrado o aumento da resistência em isolados clínicos de espécies de *Acinetobacter*, a maioria dos antimicrobianos utilizados incluía aminopenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas de pequeno e amplo espectro, cefamicinas, aminoglicosídeos, cloranfenicol e tetraciclina (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996).

A. baumannii MR é considerado um importante patógeno nosocomial em muitos países, apresentando alta prevalência de resistência a aminoglicosídeos, cefalosporinas de terceira geração, cefepime, fluoroquinolonas, piperacilina/tazobactam e outros. A resistência aos carbapenêmicos é cada vez mais comum (OTEO *et al.*, 2007).

Dados do estudo SENTRY relatam que no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2001 o Brasil apresentou com o maior número de isolados de *Acinetobacter* spp. (n = 400) da América Latina. A resistência ao imipenem foi de 8,5% no Brasil e de 20% na Argentina. A polimixina B, avaliada contra os patógenos

coletados em 2001, apresentou excelente atividade na América Latina, com suscetibilidade de 96,4% (TOGNIM *et al.*, 2004).

2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Uma ampla variedade de antimicrobianos β -lactâmicos é usada no tratamento de doenças infecciosas. Estes antimicrobianos bloqueiam a biossíntese da parede celular da bactéria pela inibição de uma transpeptidase. As transpeptidases catalisam a ligação cruzada dos polímeros de peptidoglicano na parede celular e são membros da família das proteínas ligadoras de penicilina (PBP). Entretanto, as bactérias têm desenvolvido inúmeras estratégias para resistir aos antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo a produção de uma família de enzimas denominadas de β -lactamases. Estas enzimas catalisam a hidrólise dos antimicrobianos β -lactâmicos, abrindo o anel β -lactâmico e tornando o antimicrobiano inativo (JIN *et al.*, 2004).

Carbapenêmicos como imipenem e meropenem possuem um amplo espectro de atividade e resistem à hidrólise pela maioria das β -lactamases, incluindo β -lactamases de espectro estendido e β -lactamases do tipo AmpC (JIN *et al.*, 2004; RASMUSSEN; HOIBY, 2006).

Muitos estudos relacionados à genética e à bioquímica da resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* têm sido realizados recentemente, sendo a maioria relacionados à produção de β -lactamases (POIREL; NORDMANN, 2006).

Os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, entre eles carbapenêmicos, em *A. baumannii* são: hidrólise por β -lactamases (carbapenemases), alteração nas proteínas ligadoras de penicilina (PBP), impedindo a sua ação, alterações na estrutura e número de proteínas porinas que resultam na diminuição da permeabilidade dos antimicrobianos através da membrana externa da célula bacteriana e a atividade de bombas de efluxo que promovem a diminuição da concentração do antimicrobiano no interior da bactéria (PEREZ *et al.*, 2007).

As β -lactamases têm sido agrupadas em quatro classes moleculares A, B, C e D, baseadas na homologia da seqüência dos aminoácidos, segundo a classificação de Ambler *et al.*, (1980). Aquelas que pertencem às classes A, C e D são denominadas serina- β -lactamases, pois possuem serina no sítio ativo para facilitar a catálise, e aquelas que pertencem à classe B são denominadas metalo- β -

lactamases, pois contêm um ou dois íons zinco no sítio ativo. Estas enzimas têm a propriedade comum de hidrolisar, ao menos parcialmente, imipenem ou meropenem, além de hidrolisar outras penicilinas e cefalosporinas (JIN *et al.*, 2004).

Muitas β -lactamases adquiridas têm sido identificadas como fonte da resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*, pertencentes à classe B de Ambler, conhecidas como metalo- β -lactamases, ou à classe D, também conhecidas como oxacilinas. Ambas são resistentes à inibição por clavulanato e tazobactam. Enquanto as metalo-enzimas são suscetíveis *in vitro* à inibição por EDTA, algumas oxacilinas são suscetíveis à inibição por NaCl. As metalo-enzimas têm sido identificadas em muitas espécies de bactérias gram-negativas, sendo encontradas raramente em *A. baumannii*, porém, a maioria das oxacilinas tem sido identificada apenas em *A. baumannii* (POIREL; NORDMANN, 2006).

2.5.1 Beta-lactamase Classe A

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) da classe A são mais relatadas em isolados de enterobactérias. Raramente são inibidas pelo ácido clavulânico. Podem ser codificadas tanto por cromossomos (NMC-A, SME-1, SME-2, SME-3, IMI-1) em *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens*, quanto por plasmídeos (KPC-1, GES-2) em *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa* (OLIVER, 2004).

Mais recentemente elas têm sido encontradas em isolados de *A. baumannii*. Além da β -lactamase TEM-1 ser encontrada em *A. baumannii*, PER-1 já foi relatada em isolados de *A. baumannii* na França, Bélgica, Bolívia, Turquia, Coreia e Estados Unidos. No entanto, esta enzima não confere resistência aos carbapenêmicos. Outras enzimas como VEB-1, SHV-12, TEM-92, TEM-116 e CTX-M-2 também já foram relatadas em diversos estudos com *A. baumannii*. (PEREZ *et al.*, 2007).

2.5.2. Beta-lactamase Classe B

As enzimas da classe B são as carbapenemases mais significativas clinicamente, uma vez que o aumento do número das metalo- β -lactamases (M β L) em *A. baumannii* possui grande importância na emergente resistência aos beta-lactâmicos. As metalo-enzimas, cujos genes são localizados em plasmídeos e

integrans, hidrolisam carbapenêmicos, assim como todos os β -lactâmicos, com exceção do aztreonam e requerem zinco para sua atividade, e por isso, são inibidas por compostos quelantes de cátions divalentes como o EDTA (NORDMANN; POIREL, 2002; OLIVER, 2004).

As M β L, assim como as serina β -lactamases, conferem resistência aos β -lactâmicos pela clivagem do anel β -lactâmico; no entanto, a maneira pela qual os dois grupos de enzimas alcançam esta clivagem é diferente. M β L possuem um grupo distinto de aminoácidos que define a estrutura finita do sítio ativo que coordena os íons zinco. Os íons zinco, por sua vez, coordenam a ação das moléculas de água necessárias para a hidrólise. O mecanismo de hidrólise proposto sugere que o sítio ativo orienta e polariza o anel β -lactâmico para facilitar o ataque nucleofílico pela dupla zinco-água. Ao contrário das serina β -lactamases, as M β L têm um sítio ativo de amplo encaixe e, por isso, podem acomodar a maioria dos substratos β -lactâmicos, o que facilita muito seu amplo espectro de atividade. Eles também são impenetráveis aos efeitos de impedimento dos inibidores de serina tais como ácido clavulânico e sulbactam, que são tratados como substratos pobres (WALSH *et al.*, 2005).

As M β L são produzidas intrinsecamente por determinados microrganismos como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus* e *Aeromonas* spp. No entanto, desde o início da década de 90, novos genes que codificam as M β L têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae*. Estas novas enzimas foram denominadas de M β L móveis ou adquiridas, devido ao fato dos genes serem inseridos em estruturas genéticas que fornecem mobilidade. Assim, as M β L adquiridas são codificadas por cassetes gênicos localizados no cromossomo ou plasmídeos bacterianos. No entanto, com exceção da enzima SPM-1, que é codificada por um gene localizado em plasmídeo, as demais são codificadas por genes localizados em integrans de classe 1 (MENDES *et al.*, 2006).

Atualmente são conhecidas cinco subclasses de M β L adquiridas: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase), GIM (German imipenemase) e SIM-1 (*Seoul* imipenemase).

A primeira MβL adquirida a ser caracterizada foi IMP-1, com a descoberta de cepa GN17203 de *P. aeruginosa* no Japão em 1988. O Japão era o principal reservatório de MβL tipo IMP, entre as quais estão IMP-1, IMP-2, IMP-3, IMP-6, IMP-10 e IMP-11, encontradas em um grande número de isolados de *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e enterobactérias. Em seguida, os genes de MβL tipo IMP-2 em 1997 e IMP-5 em 1998, foram relatados na Itália e Portugal, respectivamente (WALSH, 2005).

A subclasse IMP consiste de 19 variantes separadas em 7 filogrupos. Seis variantes pertencentes a três filogrupos já foram identificados em *A. baumannii*, a saber IMP-1 na Itália, Japão, e Coréia do Sul, IMP-2 na Itália e Japão, IMP-4 em Hong Kong, IMP-5 em Portugal, IMP-6 no Brasil, e IMP-11 no Japão (POIREL; NORDMANN, 2006).

VIM-1 (Verona imipenase) foi descoberta na Itália, no ano de 1997, em um isolado clínico de *P. aeruginosa*. As MβL tipo VIM possuem atualmente treze variantes conhecidas, dentre as quais apenas VIM-2 foi identificada em isolados de *A. baumannii* na Coréia.

O terceiro tipo de MβL adquirida é SPM-1 (São Paulo metalo-β-lactamase), a qual foi descrita por Toleman, *et al* (2002). Foi isolada em 1997 de amostra clínica de *P. aeruginosa* no complexo Hospital São Paulo/UNIFESP (TOLEMAN *et al.*, 2002).

GIM-1 (German imipenemase) apareceu como uma MβL única, localizada em uma estrutura distinta de integron, e representa a quarta sub-classe de MβL a ser caracterizada. Foi descrita em 2002, em amostras clínicas de *P. aeruginosa* isoladas na Alemanha (CASTANHEIRA *et al.*, 2004).

O gene *bla*_{SIM-1} foi detectado em sete isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes da Coréia entre 2003 e 2004. A enzima SIM-1 é um membro da subclasse de MβL B1 e possui grande similaridade com as enzimas tipo IMP (69% de identidade com IMP-12 e 64% com IMP-9) (LEE *et al.*, 2005).

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de amostras produtoras de MβL adquirida ocorreu em 2002, em *P. aeruginosa*. Em 2003, uma variante de IMP foi relatada por Gales *et al* (2003) em um isolado de *A. baumannii*, a qual após sequenciamento dos 400-bp apresentou similaridade com a seqüência do gene *bla*_{IMP-6}, publicada anteriormente no GenBank sob o número S71932. O isolado era resistente a imipenem, meropenem e cefalosporinas de amplo espectro, porém

suscetível a aztreonam, gentamicina e ciprofloxacina, e apresentava resistência intermediária a ampicilina/sulbactam e ampicacina (GALES *et al.*, 2003).

Tognim *et al.* (2006) pesquisaram a presença de M β L adquirida em amostras de *Acinetobacter* spp. isoladas de pacientes internados no Hospital São Paulo, no período de maio de 1993 a novembro de 2001. Entre as amostras que apresentaram resistência ou sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos, 54% (40/73) eram produtoras de IMP-1, sendo positivas as amostras isoladas a partir de 1998 (TOGNIM *et al.*, 2006).

Uma vez que as M β L necessitam de íons divalentes como o Zn⁺⁺ como cofator para a reação de hidrólise do anel beta-lactâmico, essas enzimas podem ser detectadas por meio de testes fenotípicos com o auxílio de um agente quelante, como EDTA, ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA), entre outros. Os testes de duplo disco difusão usando ceftazidima e disco com 2-MPA ou de imipenem e disco com EDTA têm sido reportados como métodos simples para detecção de M β L em isolados clínicos. No entanto é necessário o ajuste da distância entre os discos para a obtenção de resultados ideais (YONG *et al.*, 2002).

As variantes de IMP e VIM conferem altos níveis de resistência aos carbapenêmicos e β -lactâmicos, exceto aztreonam, devido à forte capacidade hidrolítica sobre estes agentes. Segundo Poirel e Nordmann (2006) a resistência aos carbapenêmicos nos isolados produtores de enzimas IMP e VIM é facilmente detectada através do uso de tiras de Etest de imipenem com EDTA.

2.5.3 Beta-lactamase Classe C

As β -lactamases da classe C são codificadas no cromossomo de bactérias gram-negativas, incluindo *Acinetobacter* spp. A cefalosporinase tipo AmpC hidrolisa penicilinas e cefalosporinas de pequeno espectro e espectro estendido, mas não cefepime e carbapenêmicos. A introdução da seqüência de inserção IS_{Aba1} acima do gene *bla*_{AmpC} aumenta a expressão da β -lactamase consideravelmente por promover a seqüência promotora, resultando na resistência a ceftazidima, mas não aos carbapenêmicos (POIREL; NORDMANN, 2006).

2.5.4 Beta-lactamase Classe D

Oxacilinasas são enzimas pertencentes à classe molecular D de Ambler e estão inclusas no grupo 2d da classificação de Bush *et al.* (1995). Geralmente hidrolisam oxacilina mais eficientemente que a benzilpenicilina. Hidrolisam também amoxicilina, metilcilina, cefaloridina e cefalotina. A eficiência hidrolítica das oxacilinasas contra carbapenêmicos é muito menor que a das M β L. (POIREL; NORDMANN, 2006).

As oxacilinasas formam um grupo heterogêneo de β -lactamases com respeito à estrutura e propriedades bioquímicas. Vinte e três oxacilinasas foram descritas inicialmente, e muitas delas são derivadas da OXA-2, OXA-3 e OXA-10 e são produzidas principalmente por *P. aeruginosa* (BOU *et al.*, 2000b). Atualmente 121 variantes diferentes de β -lactamases da classe D têm sido identificadas e 45 destas apresentam atividade hidrolítica sobre os carbapenêmicos. Estas enzimas podem ser classificadas em oito subgrupos que apresentam identidade entre os membros de cada grupo $\geq 92,5\%$ e entre os grupos diferentes a homologia é de 40 a 70 % (RASMUSSEN; HOIBY, 2006).

As carbapenemases tipo OXA produzidas por *A. baumannii* têm se disseminado rapidamente, sendo reportadas na África, Europa, Oceania, América do Sul, e Ásia. Surtos em hospitais causados por *A. baumannii* produtores de OXA-23 tem sido descritos como clonais em muitas partes do mundo (França, Polinésia, Coréia do Sul) enquanto outros não-clonais foram descritos na China, Inglaterra e Austrália (ZONG *et al.*, 2008).

As carbapenemases tipo OXA de *Acinetobacter spp.* são divididas em quatro subgrupos filogenéticos: OXA-23; OXA-24; OXA-51 e OXA-58. Recentemente tem sido sugerido que as enzimas pertencentes ao subgrupo do tipo OXA-51 sejam intrínsecas em *A. baumannii*, ocorrendo na maioria ou em todas as cepas (WOODFORD *et al.*, 2006).

A primeira oxacilinase foi descoberta em um isolado de *A. baumannii*, em 1985 na Escócia, sendo inicialmente denominada ARI-1 (*Acinetobacter* resistente a imipenem). Esta foi renomeada como OXA-23 e é a representante do grupo formado também por OXA-27 e OXA-49 (GenBank número de acesso AY28852), com 99% de homologia entre os aminoácidos (POIREL; NORDMANN, 2006)

OXA-23 ou ARI-1 β -lactamase é mediada por plasmídeos, tem um espectro de atividade incomum, não tem perfil de amplo espectro de modo que não hidrolisa cefalosporinas de segunda e terceira geração, enquanto outras carbapenemases relacionadas tem uma extensa especificidade de substratos (PATON *et al.*, 1993). O gene *bla*_{ARI-1} é composto por 882 pares de base, com o códon inicial ATG e o final TAA, que traduz uma proteína de 273 aminoácidos, apresentando uma seqüência homóloga à das enzimas da classe D (grupo 2d). Duas regiões altamente conservadas, S-T-F-K (serina-treonina-fenilalanina-lisina) e K-T-G (lisina-treonina-arginina) - posições 79 a 82 e 216 a 218 foram identificadas. Uma terceira região, F-G-N (fenilalanina-glicina-asparagina) - nas posições 152 a 154, a qual difere da região correspondente das demais enzimas OXA pela presença de fenilalanina (F) ao invés de tirosina (Y) foi observada. Esta única substituição pode ter efeitos bioquímicos significativos e é possivelmente um fator na evolução da resistência a carbapenêmicos nesta enzima (DONALD *et al.*, 2000).

O perfil de hidrólise das oxacilinases (OXA-23 a OXA-27) é muito semelhante. Elas hidrolisam fracamente imipenem e meropenem, hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam. A atividade é inibida pelo ácido clavulânico, uma propriedade incomum para oxacilinases, com exceção da OXA-23, que é resistente ao ácido clavulânico (NORDMANN; POIREL, 2002).

O segundo grupo, compreendido por OXA-24, OXA-25, OXA-26 e OXA-40, possui 63% e 60% de semelhança de aminoácidos com os grupos OXA-51/69 e OXA-23 respectivamente e entre os membros há 98% de homologia. OXA-24 e OXA-25 foram identificadas em isolados de *A. baumannii* na Espanha, enquanto a OXA-26 foi isolada na Bélgica e OXA-40 na França, Espanha e Portugal (POIREL; NORDMANN, 2006).

A oxacilinase OXA-24 é mediada por genes cromossômicos, tem atividade hidrolítica moderada contra carbapenêmicos e apresenta elementos estruturais característicos de β -lactamases de classe D. A seqüência de aminoácidos contém regiões encontradas em serina β -lactamases, todas possuem a tétrede STFK, a região YGN é substituída por FGN, a região KTG é mantida nas OXA-23 e OXA-27, e substituída por KSG nas OXA-24, OXA-25 e OXA-26. A substituição de Y por F pode ser significativa em consequência da possibilidade da hidroxila livre da tirosina poder exercer algum papel na hidrólise do anel β -lactâmico. No entanto, a

substituição de T por S na região KTG não é significativa, dada a semelhança entre os aminoácidos (BOU *et al.*, 2000; AFZAL-SHAH *et al.*, 2001).

A enzima OXA-40, descoberta em Portugal, de localização cromossômica, pertence ao mesmo grupo da OXA-24, OXA-25, OXA-26. O perfil de atividade hidrolítica é restrito, incluindo principalmente as penicilinas. A hidrólise do imipenem é de baixo nível, e não foi detectada hidrólise do meropenem (HÉRITIER *et al.*, 2003).

OXA-51 foi descoberta em isolados clínicos multirresistentes de *A. baumannii* não relacionados geneticamente, na Argentina. Nenhuma das cefalosporinas é hidrolisada pela OXA-51, com exceção da cefaloridina. A hidrólise do imipenem é lenta e meropenem não é hidrolisado. Diferenças significativas na seqüência de aminoácidos da OXA-51 foram encontradas quando comparada aos outros dois grupos de β -lactamases tipo OXA. Foram observadas algumas mudanças que são importantes para o funcionamento do sítio ativo. A mudança de treonina (T) para serina (S) ocorre na porção KTG. OXA-51 mantém a tríade YGN, em contraste aos outros dois grupos de carbapenemases, nos quais tirosina (Y) é substituída por fenilalanina (F). Assim, OXA-51 é a primeira carbapenemase de classe D que não tem esta substituição. Esta descoberta contradiz a opinião geral de que tal substituição nestas carbapenemases confere atividade hidrolítica contra os carbapenêmicos (BROWN *et al.*, 2005).

As oxacilinasas representadas pelas variantes de OXA-51/69 são enzimas cromossômicas naturalmente presentes em *A. baumannii*. Os genes que codificam β -lactamase bla_{OXA-51} foram encontrados no cromossomo de isolados de *A. baumannii* estudados em quatro continentes. Turton *et al* (2006b) detectaram o gene bla_{OXA-51} em todos os 141 isolados de *A. baumannii* pesquisados, não sendo encontrado em apenas 22 isolados de outras espécies de *Acinetobacter*. A sua expressão também varia com a inserção da seqüência móvel IS_{Aba1}. As enzimas OXA-51/69 possuem fraca identidade com as demais oxacilinasas, sendo identificadas 11 variantes isoladas em diversas regiões geográficas (POIREL; NORDMANN, 2006; PEREZ *et al.*, 2007).

OXA-58 foi caracterizada a partir de isolados de *A. baumannii* na França em 2003 e pertence ao quarto grupo de oxacilinasas. O gene bla_{Oxa-58} está localizado em plasmídeo e a sua atividade é inibida por NaCl, ao contrário das outras oxacilinasas que possuem atividade de carbapenemase (MARQUÉ *et al.*, 2005). O gene bla_{OXA-58}

foi identificado em diversas regiões geográficas incluindo França, Espanha, Turquia, Romênia, Grécia, Áustria, Inglaterra, Argentina, Kuwait e Itália (POIREL; NORDMANN, 2006). A tétrede STFK e o sítio KSG foram encontrados, além do sítio YGN , clássico das oxacilinases. OXA-58 tem pouca semelhança com os grupos homólogos, compartilhando 59% com OXA-51/69 e menos que 50% de identidade com os outros grupos. O perfil de hidrólise é semelhante ao das demais oxacilinases. (POIREL *et al.*, 2005).

Os altos níveis de resistência aos carbapenêmicos devidos à expressão de genes que codificam as carbapenemases da classe D requerem um promotor forte como a inserção da seqüência móvel IS_{Aba1}. Este é característico em *A. baumannii*, sendo encontrado em muitos surtos associados ao gene *bla*_{OXA-23}, confirmando a importância da transmissão horizontal entre as cepas circulantes no ambiente hospitalar, associada a disseminação da estrutura IS_{Aba1}-*bla*_{OXA-23} (ZONG *et al.*, 2008).

2.5.5 Outros mecanismos

Em adição às beta-lactamases a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* pode resultar de modificações nas proteínas ligadoras de penicilinas e nas porinas. Até recentemente, pouco se sabia sobre as proteínas responsáveis pela permeabilidade da membrana externa de *A. baumannii* aos antimicrobianos beta-lactâmicos. Estudos recentes têm demonstrado que *A. baumannii* possui uma proteína na membrana externa (OMP), a qual possui um importante papel na resistência aos carbapenêmicos. Limansky *et al.* (2002) demonstraram que a resistência ao imipenem em *A. baumannii* estava associada à perda da proteína de 29-kDa, em isolados onde atividade de carbapenemase não havia sido detectada (LIMANSKY *et al.*, 2002). Também tem sido reportada a resistência associada a expressão reduzida de duas proteínas (22 e 33 kDa) em isolados de *A. baumannii* MR que produzem carbapenemase tipo OXA-24, o que levaria aos altos níveis de resistência observados (POIREL; NORDMANN, 2006).

Muitas porinas, incluindo a proteína de 33-kDa CarO, constituem um canal para a eliminação de carbapenêmicos, podendo estar envolvidas na resistência a estes antimicrobianos. Recentemente a proteína de 43-kDa foi identificada como

homóloga da porina OprD (porina freqüentemente associada a resistência a imipenem em *P. aeruginosa*) em *A. baumannii* (POIREL; NORDMANN, 2006).

Apesar da resistência aos carbapenêmicos e outros beta-lactâmicos por modificação das PBPs ser característica de bactérias gram-positivas, a diminuição da expressão da PBP2 pode desempenhar um papel importante na resistência ao imipenem em *A. baumannii* (OLIVER, 2004).

As bombas de efluxo constituem um único mecanismo de resistência contra diferentes classes de antimicrobianos. Diversas famílias de bombas de efluxo têm sido encontradas e identificadas em inúmeras espécies de bactérias. Em *A. baumannii* foi caracterizada a bomba de efluxo AdeABC, da família RND, responsável por resistência a aminoglicosídeos, cefotaxima, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, trimetopim, e fluoroquinolonas. A superexpressão da bomba de efluxo AdeABC pode também, em junção com as oxacilinas, conferir resistência aos carbapenêmicos (POIREL; NORDMANN, 2006).

2.6 TRATAMENTO

O tratamento de infecções por *Acinetobacter* spp. tem sido limitado a um pequeno espectro de agentes, incluindo carbapenêmicos, amicacina, algumas tetraciclina (minociclina, doxiciclina), e ampicilina/sulbactam. A resistência aos carbapenêmicos e outros agentes tem emergido, o que torna a classe das polimixinas (colistina e polimixina B) mais usada com sucesso clínico, porém, com efeitos adversos como toxicidade renal (JONES *et al.*, 2007).

Os carbapenêmicos, representados por imipenem e meropenem, são os antimicrobianos beta-lactâmicos de mais amplo espectro e apresentam uma boa atividade frente a muitas bactérias gram-positivas e à maioria das gram-negativas. Entre as características responsáveis por seu amplo espectro estão o baixo peso molecular e sua estrutura que permitem uma rápida penetração através das membranas, sua elevada afinidade pelas PBPs e sua grande estabilidade frente à hidrólise pela maioria das beta-lactamases. Uma das aplicações clínicas mais relevantes dos carbapenêmicos é o tratamento de infecções nosocomiais por bactérias gram-negativas multirresistentes, e em algumas ocasiões são o último recurso terapêutico disponível (OLIVER, 2004).

A administração conjunta de um inibidor de β -lactamase e um antimicrobiano β -lactâmico tem tido sucesso em superar a resistência mediada por β -lactamase. Inibidores de β -lactamase possuem uma estrutura β -lactâmica, mas uma atividade antimicrobiana limitada. Seu principal valor é o de bloquear a atividade catalítica das β -lactamases contra os antimicrobianos β -lactâmicos através de ligação irreversível ao sítios ativos das enzimas produzidas pela bactéria. O espectro anti- β -lactamase destes inibidores incluem enzimas transferíveis mediadas por plasmídeos e várias enzimas de amplo espectro. Há três inibidores de β -lactamase em uso clínico: sulbactam, tazobactam, e ácido clavulânico (LEVIN, 2002).

Uma opção terapêutica é o sulbactam, que surgiu nos anos 80 como um inibidor de β -lactamase para ser usado junto a outros antimicrobianos β -lactâmicos, tais como ampicilina (CORBELLA *et al.*, 1998). Sulbactam é uma molécula β -lactâmica sintética, com estrutura, propriedades farmacocinéticas e químicas similares às das aminopenicilinas. Uma característica que distingue sulbactam de outros inibidores de β -lactamase disponíveis é sua atividade antimicrobiana direta contra *Bacteroides fragilis* e *Acinetobacter* spp. A ligação do sulbactam à PBP2 destes organismos concede a atividade intrínseca antibacteriana. A maioria das espécies de *Acinetobacter* permanece suscetível a ampicilina/sulbactam. Estudos multicêntricos relatam suscetibilidade de 81 a 100% (LEVIN, 2002).

Infelizmente, a resistência ao sulbactam tem sido observada em isolados resistentes a imipenem, sendo as polimixinas (colistina, polimixina B) as únicas alternativas de terapia (CISNEROS e BAÑO, 2002). As polimixinas têm sido efetivas no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, com pouco desenvolvimento de resistência, porém a nefrotoxicidade tem limitado seu uso. Estas drogas ficam acumuladas nos tecidos, especialmente rins e cérebro (OUDERKIRK *et al.*, 2003).

Polimixinas são um grupo de peptídeos policatiônicos naturalmente sintetizados por *Bacillus polymyxa*. Membros desta classe de antimicrobianos agem primariamente na parede celular bacteriana de gram-negativos, levando a alterações rápidas de permeabilidade na membrana citoplasmática e por último à morte da célula. Estas drogas atravessam a membrana externa bacteriana através de uma substituição competitiva de cátions divalentes por policátions, que atravessam de modo não-covalente a ponte adjacente ao componente polissacarídico. Conseqüentemente, a membrana externa é corrompida e torna-se mais permeável, o que permite a entrada aumentada de componentes

permeabilizantes. Entre as cinco polimixinas conhecidas (A até E), apenas as polimixinas B e E têm uso terapêutico avançado. (GALES *et al.*, 2001).

A colistina (polimixina E), relatada como um novo agente em 1952, é sulfometilada, o que destrói sua natureza catiônica e a torna inefetiva como um antimicrobiano. A sulfometil-polimixina deve ser hidrolisada para deixar a base ativa livre, e esta liberação ocorre à temperatura corpórea e em pH fisiológico em sistemas aquosos. A toxicidade é uma importante referência à colistina, sendo a nefrotoxicidade o mais importante efeito adverso. Em pacientes normais, a função renal pode estar diminuída durante o tratamento, mas em pacientes com doença renal pré-existente o prejuízo renal com danos residuais ocorre com maior frequência, devendo ser ajustada a posologia. Estes antimicrobianos deixaram de ser comercializados no Brasil no início dos anos 80 devido à sua alta toxicidade (LEVIN *et al.*, 1999).

Estudos recentes têm afirmado que a polimixina não é tão tóxica quanto previamente se pensava. Alguns estudos têm relatado a reintrodução da polimixina B para tratamento de infecções por bacilos gram-negativos multirresistentes. O crescente número de isolamentos de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. multirresistentes causando infecções têm renovado o potencial terapêutico do uso parenteral de polimixinas, uma vez que a droga mostra uma atividade bactericida concentração-dependente (LEVIN *et al.*, 1999; GALES *et al.*, 2001; MARKOU *et al.*, 2003).

Yoon *et al.* (2004) relataram em seu estudo a interação *in vitro* da polimixina B em combinação com imipenem ou com rifampicina. As duas combinações mostraram-se efetivas, provando ser uma alternativa de tratamento. O provável papel da polimixina B em tais sinergismos é sua rápida permeabilidade pela membrana externa, o que permite a penetração aumentada e atividade de ambos, rifampicina e imipenem. O sinergismo entre polimixina B ou outro antimicrobiano peptídico e os carbapenêmicos seria esperado quando a resistência aos carbapenêmicos é mediada pela proteína de porina deficiente. O sinergismo pode não ser evidente se o microrganismo possuir atividade de carbapenemase significativa por β -lactamase de classe B (YOON *et al.*, 2004). Mais recentemente, Bassetti *et al.* (2008) relataram resposta clínica e microbiológica em 76% dos casos de infecções graves por *A. baumannii* MR tratadas com a associação entre polimixina/rifampicina.

As tetraciclinas podem ser uma opção de tratamento viável baseada na boa atividade *in vitro* e o sucesso em modelos animais de pneumonia por *A. baumannii*, conforme observado em alguns estudos. Wood *et al.* (2003) relataram em seu estudo a utilização de minociclina e doxiciclina no tratamento de pneumonia associada à ventilação mecânica causada por *A. baumannii* MR. Dados do estudo SENTRY demonstraram boa atividade *in vitro* da tetraciclina contra *Acinetobacter* spp., onde inibiu 57,1% - 58,8% em concentrações $\leq 4\mu\text{g/ml}$ (GALES *et al.*, 2001).

Um grupo de peptídeos naturais e sintéticos extraídos a partir de uma variedade de fontes tem demonstrado atividade *in vitro* quando testado contra isolados nosocomiais de *A. baumannii* MR. Um destes peptídeos, designado “proteína de aumento de permeabilidade/bactericida” (BPI), tem exercido ação bactericida sobre uma ampla variedade de bacilos gram-negativos. Há relatos de estudos com o recombinante BPI₂₁ e cecropin P1 que demonstram atividade destes antimicrobianos contra isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes a polimixina B. Um híbrido cecropin A - melitin também tem demonstrado aumento de eficácia quando comparado com polimixina B contra linhagens de *Acinetobacter* MR (URBAN; SEGAL-MAURER; RAHAL, 2003).

Novos antimicrobianos são sintetizados e testados contra microrganismos resistentes aos medicamentos utilizados na prática clínica. A tigeciclina, um novo antibiótico da classe das glicilciclinas, tem apresentado atividade promissora *in vitro* contra muitos patógenos, incluindo cepas multirresistentes de *A. baumannii* (HOBAN *et al.*, 2005).

Tigeciclina (Tygacil[®], Wyeth Pharmaceuticals) é o primeiro antimicrobiano da classe das glicilciclinas e possui estrutura análoga à minociclina, que foi desenvolvida para evitar a resistência à tetraciclina pelos determinantes *tet*(M) e *tet*(O) que promovem proteção ribossomal e bomba de efluxo por *tet*(A-E) e *tet*(K). É indicada segundo o FDA para o tratamento de infecções de pele e suas estruturas e infecções intra-abdominais complicadas. Como as tetraciclinas, a tigeciclina se liga à subunidade 30s do ribossoma bacteriano e inibe a síntese protéica pela prevenção da incorporação de resíduos de aminoácidos no alongamento da cadeia peptídica. Exibe atividade *in vitro* contra uma ampla variedade de microrganismos gram-positivos e gram-negativos aeróbios (ex. *S. aureus* oxacilina resistentes, enterococos vancomicina resistentes, enterobactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido), anaeróbios, microrganismos atípicos e micobactérias de

crescimento rápido. É disponível somente para uso intravenoso e sua posologia é de 100 mg iniciais, seguida de 50 mg a cada 12 horas. (BETRIU *et al.*, 2006; DOAN *et al.*, 2006; CERCENADO, 2007). Deficiências no seu espectro de ação incluem os gêneros *Proteus* spp. e *Pseudomonas* spp., que possuem resistência intrínseca mediada cromossomicamente por bombas de efluxo multidrogas da família RND (PELEG *et al.*, 2007).

Estudos têm sido realizados para avaliar o emprego da tigeciclina no tratamento de bacteriemia e pneumonia associada à ventilação mecânica (VAP) causadas por *A. baumannii* MR. Schafer *et al.* (2007) demonstraram que 21 (84%) de 25 pacientes tiveram resolução clínica, enquanto outros 4 tiveram falência clínica quando tratados com tigeciclina sozinha ou associada a outros antimicrobianos. A resistência completa ou intermediária ao imipenem e à tigeciclina foi observada em 23 (92%) de 25 isolados e 7 (35%) de 20 isolados respectivamente.

Casos de *A. baumannii* resistentes à tigeciclina já foram descritos na literatura. Peleg *et al.* (2007) relataram dois casos de bacteriemia causada por *A. baumannii* resistente à tigeciclina, cuja resistência pôde ser atribuída ao mecanismo de bombas de efluxo. Venezia *et al.* (2007) relataram 66% de resistência, 12% de suscetibilidade intermediária e 22% de sensibilidade à tigeciclina em 82 isolados de *A. baumannii* MR coletados em Israel no ano de 2003.

2.7 TIPAGEM MOLECULAR

Dados recentes indicam que clones de *A. baumannii* têm causado epidemias graves pela Europa, tornando o conhecimento da diversidade dentro da espécie extremamente necessário. Como *A. baumannii* é um patógeno nosocomial clássico, é muito importante o uso de ferramentas epidemiológicas que possam traçar a extensão das infecções nosocomiais associadas a este microrganismo. Assim, a tipagem molecular é essencial no estudo de epidemiológico de *A. baumannii* e seu avanço epidêmico (GRUNDMANN *et al.*, 1997).

Uma ampla variedade de técnicas fenotípicas e genotípicas já foi empregada para identificar, classificar e tipificar *Acinetobacter* spp., entre elas biotipagem, sorotipagem, fagotipagem, análise de frações do envelope celular usando proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS lipopolissacarídeo), ribotipagem, eletroforese enzimática multilocus (MLEE), análise de DNA polimórfico amplificado

aleatório (RAPD), análise de seqüências repetitivas baseadas em PCR (rep-PCR), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), a maioria usando a enzima de restrição Apal, amplificação de fragmentos de restrição selecionados (AFLP), análise de DNAr amplificado, e tipagem seqüência multilocus (MLST) (CARRETTO *et al.*, 2008). Entre os vários métodos genéticos desenvolvidos para a tipagem de microrganismos a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é considerada padrão ouro de tipagem epidemiológica (SEIFERT *et al.*, 2005).

O aumento no emprego da PFGE, não apenas como pesquisa, mas também na rotina das análises epidemiológicas em laboratórios de diagnóstico clínico, têm resultado no desenvolvimento de diversos protocolos para a tipagem da mesma espécie. Portanto, tem sido enfatizada a necessidade de padronização da técnica para que os resultados interlaboratoriais apresentem reprodutibilidade quando analisados em diferentes locais, para que possa ser monitorada a disseminação geográfica de clones epidêmicos (SEIFERT *et al.*, 2005).

O procedimento de PFGE consiste em envolver o microrganismo em agarose, proceder a lise *in situ* e digerir o DNA cromossomal com endonucleases de restrição que não o clivam com freqüência. Pedacos de agarose contendo fragmentos de DNA cromossomal são submetidos a eletroforese em gel de campo pulsado com alternância de corrente e os fragmentos de restrição são definidos dentro de padrões de bandas descritas no gel devido a um aparelho que muda as direções da corrente de acordo com o padrão pré-estabelecido. Os padrões de DNA de restrição são então comparados com outros relacionados. Como não haviam critérios padronizados para a análise de fragmentos, diferentes pesquisadores observando os mesmos resultados puderam definir conclusões sobre quais isolados poderiam ser designados como relacionados em um surto epidêmico e quais não seriam designados como relacionados (TENOVER *et al.*, 1995).

Isolados relacionados epidemiologicamente são obtidos de materiais coletados de pacientes, fômites e meio ambiente durante um período de tempo ou numa área bem definida como parte de uma investigação epidemiológica que sugere que os isolados podem ser derivados de uma fonte comum. Isolados geneticamente relacionados, também denominados clones, são isolados que são indistinguíveis entre si por testes genéticos (PFGE, ribotipagem) ou que são tão similares que se presume que sejam derivados de um ancestral comum (TENOVER *et al.*, 1995).

Para interpretar os fragmentos de DNA obtidos por PFGE e transformá-los em uma informação epidemiológica importante é necessário entender como comparar os padrões e como os eventos genéticos podem alterar os padrões. Entre os eventos genéticos randômicos mais comuns, estão os pontos de mutação, inserção e deleção de DNA, que alteram os padrões de PFGE durante o curso de um surto. Primeiramente é realizada a análise dos padrões para identificar um padrão comum ao surto, o qual será representante do padrão do surto. Se não há padrão comum, então os isolados não são relacionados. Depois de identificado o padrão, o tamanho e número de fragmentos são comparados com os fragmentos dos outros isolados. O pareamento é feito através da comparação de fragmento por fragmento, onde cada isolado será classificado em comparação ao padrão. Padrões que são diferentes do surto por dois ou três fragmentos diferentes serão considerados como subtipos do padrão. A seguir estão descritos os critérios de interpretação para o PFGE propostos por Tenover *et al.* (1995).

- Altamente relacionados ou idênticos: isolados são designados geneticamente idênticos se o padrão de restrição possui o mesmo número de bandas e estas o mesmo tamanho aparente. A interpretação epidemiológica dos resultados é que são representantes da mesma estirpe, ou seja, possuem o mesmo padrão que representa o surto.
- Muito relacionados ou semelhantes: um isolado é considerado muito relacionado ao surto se o mesmo difere do padrão em duas ou três bandas diferentes.
- Possivelmente relacionados: um isolado é considerado como possivelmente relacionado ao surto se o mesmo difere do padrão por mudanças que resultam em quatro a seis bandas diferentes.
- Não relacionados ou distintos: um isolado é considerado como não relacionado ao surto se o seu padrão de PFGE difere do padrão por mudanças que geram sete ou mais bandas diferentes (TENOVER *et al.*, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

O presente trabalho dá continuidade ao estudo da coleção de amostras de *A. baumannii* isoladas no período de outubro de 2002 a maio de 2005 na rotina da Seção de Bacteriologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR). No entanto, dois isolados não foram incluídos e novos experimentos foram realizados no presente trabalho com 227 isolados desta coleção.

As 227 amostras foram provenientes de 178 pacientes internados no HC-UFPR, sendo obtida uma amostra em 141 pacientes; duas amostras em 27 pacientes; três amostras em nove pacientes e cinco amostras de um paciente.

Os isolados bacterianos foram provenientes das seguintes amostras clínicas: aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar (LBA), líquido, sangue, cateter, líquido peritoneal, urina, abscesso, biópsia, inserção de cateter e líquido abdominal. Entre estes, aspirado traqueal foi o sítio de isolamento mais freqüente, responsável por 50% dos isolados. Outros sítios com maior número de isolados foram sangue (21%), urina e cateter (8%), LBA (5%), líquido (3%), líquido peritoneal (2%) e outros sítios (3%). O trato respiratório inferior (LBA e aspirado traqueal) respondeu por mais da metade das amostras (55%).

As unidades de internação incluídas no estudo foram UTI-adulto, serviço de emergência clínica adulto (SEC-adulto), ortopedia, urologia, clínica médica masculina (CMM) e feminina (CMF), infectologia, cirurgia do aparelho digestivo, neurologia, neurocirurgia, transplante hepático, risco intermediário, UTI-SEC, UTI-cardiológica, UTI-pediátrica e pronto atendimento. A unidade de internação com o maior número de amostras foi a UTI-adulto (60%), seguida por SEC-adulto (18%), UTI-SEC (5%), CMF (3%), e demais unidades (14%).

As amostras selecionadas haviam sido identificadas por testes bioquímicos de rotina segundo o manual da Sociedade Americana de Microbiologia (ASM) (YORK *et al.*, 2004) e submetidos ao antibiograma pelo método Kirby-Bauer (NCCLS 2003 (M7-A6) na Seção de Bacteriologia do HC-UFPR, segundo os critérios de interpretação estabelecidos pelo NCCLS 2003 (M2-A8) e CLSI 2005 (M100-S15).

Os isolados bacterianos foram armazenados em tubo criogênico contendo caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) com 10% de glicerol, em freezer -80°C.

3.1.1 Caracterização preliminar das amostras de *A. baumannii*

Em 2006, Luiz iniciou os estudos com esta coleção de amostras e realizou os seguintes experimentos:

As amostras foram submetidas à identificação complementar para confirmação da espécie *A. baumannii*, segundo provas bioquímicas estabelecidas por MacFaddin (2000), dados não apresentados.

O perfil de resistência das amostras de *A. baumannii* foi caracterizado a partir dos resultados obtidos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de ágar-diluição para 12 antimicrobianos utilizados na prática clínica, de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). As amostras apresentaram 100% de resistência aos antimicrobianos ampicilina/sulbactam (SAM), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP) e cefepime (CPM). Para os antimicrobianos amicacina (AMI), gentamicina (GEN), imipenem (IPM) meropenem (MEM), sulfametoxazol/trimetropim (SUT), e piperacilina/tazobactam (PTZ) a percentagem de resistência também foi elevada, sendo de 96,5%, 97,8%, 97,8%, 97,4%, 87,7% e 99,5%, respectivamente. Polimixina B foi o antimicrobiano para o qual houve 98,7% de suscetibilidade.

Além do elevado perfil de resistência aos diversos antimicrobianos testados, foram observados diferentes antibiótipos entre as amostras (tabela 1). Os antibiótipos 1 a 5 correspondem aos isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. Os antibiótipos 6 a 10 correspondem aos isolados sensíveis a imipenem e/ou meropenem.

TABELA 1 – ANTIBIOTIPOS ENCONTRADOS E DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE ISOLADOS DE *A. baumannii* MULTIRRESISTENTES ISOLADOS DO HC-UFPR

ANTIMICROBIANOS	ANTIBIOTIPOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amicacina	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S
Amp./Sulbactam	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Aztreonam	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftazidima	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ciprofloxacino	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefepime	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Pip./Tazobactam	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Gentamicina	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
Imipenem	R	R	R	R	R	S	I	R	S	S
Meropenem	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
Polimixina B	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
Sulfa./trimetopim	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Total de isolados	28	4	4	184	2	1	1	2	2	1

Fonte: LUIZ, 2006.

Foi pesquisada em 229 isolados de *A. baumannii* a presença de oxacilinase (gene *bla_{OXA-23}*), através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR-*Polymerase Chain Reation*) com iniciador específico para OXA-23, sendo utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores 5' GATCGGATTGGAACCAGA 3' e 5' ATTTCTGACCGCATTTCAT 3' (WOODFORD, *et al.*,2006). Obteve-se produto de PCR compatível com o fragmento amplificado do gene *bla_{OXA-23}*, com 501 pb, em 222 isolados. A restrição enzimática com a enzima Hind III, que gerou fragmentos de 110 e 390 pb em todos os produtos de PCR de OXA-23 e seqüenciamento de uma das amostras confirmaram a presença da enzima oxacilinase OXA-23. A pesquisa de MβL foi realizada pelo teste de duplo-disco difusão (TDDD) e por PCR (genes *bla_{IMP-1}*, *bla_{SPM-1}*, *bla_{VIM-1}* e *bla_{VIM-2}*). O TDDD apresentou resultado positivo para MβL em 41 amostras, das quais uma apresentou produto compatível com o gene *bla_{IMP-1}*, sendo confirmada posteriormente por seqüenciamento como enzima *IMP-like*. Não houve produto de amplificação para os genes *bla_{SPM-1}*, *bla_{VIM-1}* e *bla_{VIM-2}* (LUIZ, 2006).

3.2 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS – TIGECICLINA E AMPICILINA-SULBACTAM

3.2.1 Disco difusão

3.2.1.1 Agentes antimicrobianos

A atividade dos antimicrobianos tigeciclina e ampicilina-sulbactam (Oxoid, Wade Road, England) frente aos isolados de *A. baumannii* foram determinadas através do método de disco difusão (DD), realizado segundo normas do CLSI 2006 (M2-A9).

3.2.1.2 Inóculo

O inóculo dos isolados bem como dos controles foi preparado fazendo-se uma suspensão direta, em solução salina, de colônias isoladas selecionadas numa placa de ágar trípico de soja (TSA) de 18 a 24 horas. A suspensão foi ajustada com auxílio de densitômetro Densimat (Biomerieux) com comprimento de onda de 625nm, para que a concentração bacteriana tivesse turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Para o controle do método foram utilizadas as cepas de referência *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922.

3.2.1.3 Inoculação no ágar

Com o auxílio de swab estéril a suspensão foi aplicada na placa de ágar Mueller-Hinton, realizando-se movimentos em três direções a fim de que a placa ficasse totalmente preenchida. Após as placas estarem secas foram aplicados os discos de antimicrobianos com auxílio de pinça estéril. Em seguida as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 35 ± 2 °C por um período de 20 a 24 horas.

3.2.1.4 Leitura dos halos

Após o período de incubação os halos de inibição dos antimicrobianos testados frente aos isolados foram lidos com auxílio de régua milimetrada. Para

ampicilina-sulbactam os valores lidos foram interpretados segundo os valores dos pontos de corte do CLSI 2006 (M2-A9). Entretanto, para a tigeciclina os pontos de corte para o teste de disco difusão foram utilizados os mesmos que para enterobactérias, propostos por *Food and Drug Administration* (U.S.FDA) e Jones (2007) (tabela 2).

TABELA 2 – CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE DO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO PARA ISOLADOS DE *A. baumannii* e CEPAS CONTROLE

ANTIMICROBIANO	R (mm)	I (mm)	S (mm)	<i>E. coli</i> 25922 (mm)	<i>S. aureus</i> 29213 (mm)
Tigeciclina 15 µg ⁽¹⁾	≤14	15-18	≥19	20-27	20-25
Tigeciclina 15µg ⁽²⁾	≤12	13-15	≥16		
Ampicilina-sulbactam 10/10µg	≤11	12-14	≥15	19-24	29-37

LEGENDA: Sensível (S); Intermediário (I); Resistente (R);

NOTA: (1) *Food and Drug Administration* (U.S.FDA)

(2) Jones, 2007

3.2.2 Diluição em ágar

A Concentração Inibitória Mínima para a tigeciclina foi determinada pelo método de diluição em ágar. O procedimento foi realizado segundo normas do CLSI 2006 (M7-A7), submetendo um inóculo bacteriano de concentração padronizada a concentrações crescentes de antimicrobiano, verificando o crescimento visível do microrganismo após 20 a 24 horas de incubação em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. O controle de qualidade foi realizado utilizando-se as cepas de referência *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213.

3.2.2.1 Agente antimicrobiano

A atividade do antimicrobiano tigeciclina frente aos isolados de *A. baumannii* foi determinada utilizando-se tigeciclina obtida de fontes comerciais, sendo esta diluída em água esterilizada. A equação a seguir foi utilizada para determinar a quantidade necessária para a solução padrão:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (ml)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potência } (\mu\text{g/mg})}$$

A solução estoque de tigeciclina foi preparada na concentração de 800 $\mu\text{g/ml}$, esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μ , acondicionada em criotubos e armazenada em freezer a -80°C , com validade de 6 meses. O intervalo das concentrações testadas foi de 0,12 a 16 $\mu\text{g/ml}$.

Foram considerados os critérios de interpretação da concentração inibitória mínima (CIM) para enterobactérias publicados pelo *Food and Drug Administration* (U.S.FDA) (tabela 3).

TABELA 3 – CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE DO TESTE DE DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA AMOSTRAS DE *A. baumannii* e CEPAS CONTROLE FRENTE À TIGECICLINA

FONTE	S ($\mu\text{g/ml}$)	I ($\mu\text{g/ml}$)	R ($\mu\text{g/ml}$)	<i>E. coli</i> 25922 ($\mu\text{g/ml}$)	<i>S. aureus</i> 29213 ($\mu\text{g/ml}$)
US FDA	≤ 2	4	≥ 8	0,03 – 0,25	0,03 – 0,25

LEGENDA: Sensível (S); Intermediário (I); Resistente (R);
 FONTE: *Food and Drug Administration* (U.S.FDA)

3.2.2.2 Diluição do Antimicrobiano em Placas de Ágar Mueller-Hinton

Foram feitas as diluições seriadas, a partir da solução-estoque de tigeciclina, em soro fisiológico a 0,9%. Alíquotas de 49 ml de ágar Mueller-Hinton foram preparadas, autoclavadas e mantidas em banho-maria à temperatura de 45 a 50 $^{\circ}\text{C}$. O ágar liquefeito e a diluição da tigeciclina foram homogeneizados completamente e distribuídas em placas de Petri descartáveis de 150 x 15 mm, obtendo-se uma camada de ágar de 3 a 4 mm de espessura. Após a solidificação do ágar à temperatura ambiente as placas foram embaladas em filmes plásticos e armazenadas em geladeira à temperatura de 2 a 8 $^{\circ}\text{C}$, sendo utilizadas em até 72h.

3.2.2.3 Preparo do Inóculo Bacteriano

O inóculo, tanto dos isolados testados quanto dos controles, foi preparado fazendo-se uma suspensão direta, em solução salina, de colônias isoladas selecionadas numa placa de ágar TSA de 18 a 24 h. A suspensão foi ajustada com auxílio de densitômetro Densimat (Biomerieux) com comprimento de onda de 625 nm para que sua turbidez coincidissem com a da solução padrão 0,5 de McFarland, que contém aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Os inóculos foram diluídos 1:10 em solução salina esterilizada para obter uma concentração de 10^7 UFC/ml. O aplicador de Steer utilizado tem pontas de 3 mm que aplicam 2 μ l, assim, o inóculo final em ágar teve aproximadamente 10^4 UFC por pino.

3.2.2.4 Diluição em Ágar

Os inóculos bacterianos (10^7 UFC/ml) foram distribuídos em alíquotas de 100 μ l em placa de ELISA com 96 poços, possibilitando a aplicação rápida e simultânea na superfície do ágar.

As placas de ágar foram marcadas para orientar os pontos de inóculo. A inoculação nos meios foi realizada utilizando o multi-inoculador de Steer com 96 pinos que dispensa aproximadamente 2 μ l de solução por pino.

Primeiramente foi inoculada uma placa de controle do crescimento (sem agente antimicrobiano) e, a seguir, começando pela concentração mais baixa, foram inoculadas as placas contendo as diferentes concentrações de antimicrobiano. Por último, foi inoculada uma segunda placa de controle do crescimento para verificar se houve contaminação ou transferência significativa de antimicrobiano durante a inoculação.

As placas inoculadas permaneceram à temperatura ambiente até que a umidade nos pontos de inoculação tivesse sido absorvida, no máximo por 30 min. Em seguida foram invertidas e incubadas em estufa a $35 \pm 2^\circ$ C por 20 a 24 h.

3.2.2.5 Determinação dos Pontos de Corte nos Testes de Diluição em Ágar

As placas foram colocadas numa superfície escura, não refletiva. A CIM foi registrada como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento, descartando qualquer colônia ou turvação leve causada pelo inóculo. Foram determinadas a CIM₅₀ – concentração do antimicrobiano em que 50% dos isolados tiveram seu crescimento inibido, e a CIM₉₀ – concentração do antimicrobiano onde 90% dos isolados tiveram seu crescimento inibido.

3.3 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO- β -LACTAMASE

A pesquisa da presença de M β L em *A. baumannii* pode ser realizada por diferentes metodologias fenotípicas, dentre estes os mais utilizados são teste de duplo-disco difusão (TDDD) e disco combinado (DC) entre substratos e inibidores enzimáticos e fitas de Etest® M β L (AB Biodisk).

No intuito de avaliar se os métodos fenotípicos apresentam resultados falso-positivos, um grupo de amostras foi submetido a diferentes métodos de detecção fenotípica de M β L. Foram testadas 40 amostras de *A. baumannii* M β L positivas no TDDD, utilizando ceftazidima (CAZ) frente ao ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), sendo apenas uma amostra confirmada por apresentar produto de PCR compatível com o gene *bla*_{IMP-1} (LUIZ, 2006).

O inóculo de cada isolado de *A. baumannii* foi preparado com turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, com auxílio de densitômetro Densimat (Biomérieux) com comprimento de onda de 625 nm. A suspensão foi semeada com swab estéril em placa de ágar Mueller-Hinton de acordo com o protocolo recomendado para disco-difusão pelo CLSI 2006 (M2-A9), sendo posicionados os discos testados conforme figura 2. O controle positivo utilizado foi um isolado de *A. baumannii* produtor de IMP-1.

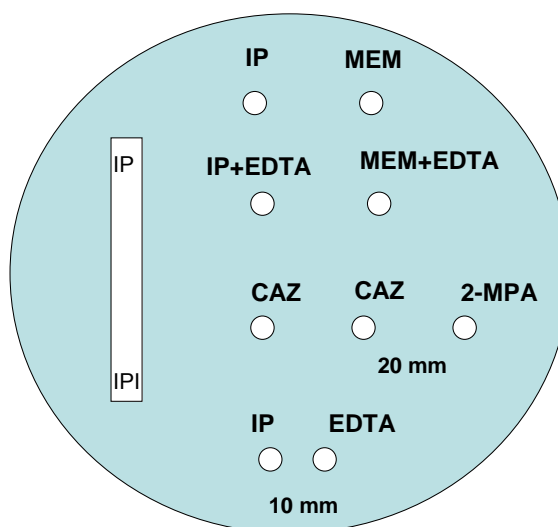


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE DISTÂNCIAS, SUBSTRATOS E AGENTES QUELANTES TESTADOS PARA A DETECÇÃO FENOTÍPICA DE AMOSTRAS PRODUTORAS DE M β L

NOTA: IP – imipenem. MEM – meropenem; CAZ – ceftazidima; EDTA ácidetilenodiaminotetracético, 2-MPA - ácido 2-mercaptopropiônico

3.3.1 Teste de duplo-disco difusão (TDDD)

Um disco de ceftazidima 30 μ g (CAZ) foi colocado na placa a uma distância de 20 mm de um disco de papel de filtro impregnado com 3 μ l de uma solução pura de ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA). Um disco de CAZ afastado dos demais foi utilizado para visualização da inibição sem influência do inibidor da enzima (ARAKAWA *et al.*, 2000).

Foi também verificado o sinergismo entre o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e imipenem, sendo utilizado disco de imipenem 10 μ g (IPM), o qual foi colocado a uma distância de 10 mm de um disco de papel de filtro impregnado com 5 μ l de uma solução de EDTA a 0,5M. Um disco de IPM afastado dos demais foi utilizado para visualização da inibição sem influência do inibidor da enzima. As placas foram incubadas a 35 °C por 18 a 24h.

O critério de interpretação foi a observação do aumento da zona de inibição na área entre o disco de 2-MPA, e/ou o de EDTA, e o disco de CAZ, e/ou IPM

devido ao sinergismo com os inibidores de M β L, comparados com os discos controles inseridos na mesma placa, e/ou a formação de zona fantasma, ou seja, um halo sem crescimento bacteriano entre os discos. A inalteração no halo de inibição de crescimento da bactéria testada foi interpretada como resultado negativo (YAN *et al.*, 2004).

3.3.2 Teste do Disco Combinado (DC)

Foram utilizados discos de imipenem 10 μ g (IPM) em duplicata, sendo que em um deles adicionou-se 5 μ l de uma solução de EDTA a 0,5M.

Também foram utilizados discos de meropenem 10 μ g (MEM) em duplicata, sendo um deles adicionado de 5 μ l de uma solução de EDTA a 0,5M.

Para ambos os substratos o resultado foi positivo quando a diferença entre os halos de IPM e/ou MEM e IPM e/ou MEM+EDTA foi ≥ 7 mm, sendo feita leitura dos halos com régua milimetrada (YONG *et al.*, 2002).

Este teste foi realizado posteriormente com todos os 227 isolados de *A. baumannii*.

3.3.3 Etest® M β L

Foi utilizado teste comercial (Etest® M β L - AB BIODISK) para detecção de metalo- β -lactamase, o qual consiste numa fita plástica contendo gradientes de concentrações de imipenem de 4 a 256 μ g/ml (IPM) de um lado da tira e gradientes de IPM+EDTA de 1 a 64 μ g/ml (IPI) na outra extremidade. O teste foi considerado positivo quando foi observada uma redução no MIC ≥ 3 log ou IPM/IPI ≥ 8 (WALSH *et al.*, 2002).

3.4 DETECÇÃO GENOTÍPICA DE METALO- β -LACTAMASE

As amostras detectadas pelo método fenotípico de DC IPM+EDTA como produtoras de M β L foram confirmadas através da pesquisa dos genes codificadores dessa enzima (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{SPM-1}) por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Os isolados a serem pesquisados foram inicialmente cultivados em ágar TSA por 18 a 24h a 37 °C. A extração do DNA foi realizada a partir de colônias isoladas,

sendo feita uma suspensão bacteriana densa de cada isolado em um tubo tipo *eppendorff*, contendo 500 µl de água ultrapura esterilizada. Estes foram homogeneizados em vortex e em seguida incubados no termobloco a 100 °C por 15 min. Após a incubação os tubos foram centrifugados a 3.000 rotações por minuto (rpm) por 15 min a 20 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo *eppendorff* e armazenado a 4 °C até o uso.

Em fluxo laminar, foi preparada a mistura de reação contendo: tampão de enzima 10X, solução de MgCl₂ 50mM, desoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs) 10mM, 50ng/µl de cada oligonucleotídeo iniciador, água deionizada esterilizada, *Taq* polimerase 2,5 U. A mistura de reação foi mantida a aproximadamente 4°C durante seu preparo e, após leve agitação, 23 µl foram transferidos para cada tubo de amplificação, aos quais foram adicionados 2 µl do DNA bacteriano extraído previamente.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram baseados nas regiões conservadas de cada gene seguindo a seqüência consenso determinada por Sader *et al* (2005).

Na amplificação do gene *bla*_{IMP-1} foi utilizado o iniciador da fita sentido (*sense*) 5' CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC 3' e da fita anti-sentido (*anti-sense*) 5' GAACAACCAGTTTTGCCTTACC 3'. A mesma seguiu as condições de amplificação descritas por Gales *et al* (2003), 35 ciclos de desnaturação a 94°C 1min, pareamento a 61°C 1min, e amplificação a 72°C 1min.

Na amplificação do gene *bla*_{SPM-1} foi utilizado o iniciador da fita sentido 5' CCTACAATCTAACGGCGACC 3' e da fita anti-sentido 5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 3'. As condições de amplificação, descritas por Toleman *et al.* (2002) foram as seguintes: desnaturação a 95 °C por 5min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1min, 40°C por 1min e 68°C por 1min, e extensão final a 68°C por 5min.

Os produtos da PCR foram mantidos a 4°C até serem utilizados. Como controles positivos e negativos foram utilizadas amostras de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1, *A. baumannii* produtor de IMP-1 e cepa de referência ATCC *P. aeruginosa* 27853.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 0,5x (Tris-Borato-EDTA). Foram adicionados 4 µl de brometo

de etídio no preparo de 90 ml de gel. Após a solidificação do mesmo foram preparadas as amostras misturando-se 8 µl de tampão de corrida (50mM EDTA pH 8,25% ficol, 0,25% azul de bromofenol) com 2 µl de produto de PCR de cada amostra. A mesma proporção foi usada para os controles positivo e negativo. Para o marcador de peso molecular 1000 pb Plus DNA ladder (Invitrogen) foi feita a proporção de 1 µl de marcador para 3 µl de tampão de amostra. O gel foi carregado com cada amostra e submetido à eletroforese sob voltagem constante de 120 V por 70 min. Após a corrida o gel foi visualizado e fotografado com luz ultravioleta (320nm) em transiluminador.

3.5 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

3.5.1 Preparo dos blocos com DNA

Inicialmente foi realizada a cultura dos isolados em ágar TSA, sendo os mesmos incubados em estufa por 18 a 24 h a 36 °C. No segundo dia cerca de 10 a 20 colônias isoladas foram inoculadas em meio de cultura enriquecido (caldo TSB) e incubados em estufa por 24h a 36 °C. Após estes cultivos, no terceiro dia, foi centrifugado o meio de cultura líquido contendo as bactérias por 15 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo as células bacterianas foi diluído com 500 µl de tampão SE (Salina/EDTA) (ANEXO 1). Este homogeneizado foi transferido para um tubo de microcentrífuga cônico previamente pesado, com capacidade de 1500 µl.

Os tubos foram centrifugados por 1 min a 12.000 rpm a 20°C, e o sobrenadante foi removido. Pesaram-se novamente os microtubos contendo a massa celular bacteriana. Subtraiu-se o peso de cada amostra do peso de cada microtubo e, para o valor encontrado em miligramas, adicionou-se o volume em µl de tampão SE, na concentração final de 1mg/µl. A seguir, em outro tubo contendo 300 µl de tampão SE foram adicionados 7 µl da suspensão bacteriana, homogeneizou-se em vortex, e na seqüência foram adicionados 300 µl de agarose de baixo ponto de fusão a 2%. Estes foram homogeneizados rapidamente e distribuídos nos orifícios do molde para a formação dos blocos de gel com auxílio de pipetas descartáveis. O molde foi armazenado em geladeira por 30 min para que os

blocos solidificassem. Os blocos foram transferidos para frascos de vidro contendo 3 ml de tampão de extração para gram-negativos (ANEXO 1), adicionado de proteinase K (50mg/ml) e lisozima (20mg/ml). Os mesmos foram incubados em banho-maria a 56°C, por 18 a 24 h. Após 24 h de incubação foi removido este tampão e substituído por outro semelhante, sendo novamente incubados. Após a segunda incubação o tampão foi removido e realizou-se quatro lavagens com 3 ml de tampão TE (tris/EDTA)(ANEXO 1), aguardando 30 min sob refrigeração entre as lavagens. Após as lavagens os blocos foram armazenados em criotubos contendo tampão TE, podendo ser armazenadas em geladeira por até 6 meses.

3.5.2 Clivagem do DNA com Enzima de Restrição

Uma parte do bloco de aproximadamente 4 mm foi selecionada por corte para clivagem com a enzima Apal (Invitrogen). Esse pequeno bloco foi transferido para um tubo tipo *ependorff* de 500 µl e imerso em 100 µl de tampão de enzima, permanecendo por no mínimo 30 min em geladeira a 4 - 8°C. Após esse período o tampão foi retirado e 100 µl de uma nova solução tampão contendo 30 U de enzima Apal foi adicionada ao bloco e incubado em banho-maria a 37°C por 18 horas.

3.5.3. Eletroforese

Foi preparado o gel de agarose a 1,2% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) (ANEXO 1) na quantidade de acordo com o tamanho do molde a ser usado. Este foi fundido e colocado no molde e aguardou-se 30 min para que o gel polimerizasse. Foi preparado 3000 ml de tampão TBE 0,5% e colocado na cuba de eletroforese e programado o resfriamento para 12° C. Na seqüência, após solidificado o gel os blocos foram transferidos para os espaços destinados sendo também adicionado padrão de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker, Biolabs) e posteriormente foram vedados com agarose de baixo ponto de fusão. O gel foi retirado do molde, colocado na cuba e fechada a tampa. Depois de estabilizada a temperatura de incubação foi iniciada a corrida eletroforética.

A eletroforese foi realizada de acordo com o sistema CHEF – DR III (Bio Rad Laboratories, USA) sob as seguintes condições: 30 horas a 12°C, utilizando uma

corrente elétrica de 200 volts (6 V/cm), ângulo de 120°, tempo de pulso inicial de 5s e tempo de pulso final de 35s.

Os géis foram corados com brometo de etídio 0,05 µl/ml durante 90 min e fotografados em transiluminador sob luz ultravioleta (320nm).

Inicialmente foi feita a análise das fotografias dos géis sob inspeção visual segundo os critérios propostos por Tenover *et al.* (1995). Em seguida foram submetidos ao programa Gel-Pro Analyzer 4.0 para determinar o peso molecular das bandas. Após a construção da matriz disjuntiva esta foi submetida ao programa NTSYS para a construção do dendrograma com auxílio do coeficiente de Dice.

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os resultados dos testes de suscetibilidade frente a tigeciclina das 227 amostras de *A. baumannii* MR estudadas foram avaliados de acordo com os critérios citados anteriormente. No método de disco difusão os resultados apresentaram 0,4% e 6,2% de sensibilidade, seguindo os critérios propostos por U.S.FDA e Jones (2007), respectivamente. Os resultados do método de ágar diluição apresentaram 2,2% de sensibilidade intermediária e 97,8% de resistência, seguindo os critérios propostos por U.S.FDA (tabela 4). A determinação da concentração inibitória mínima CIM₅₀ e CIM₉₀ foi de 16 µg/ml.

TABELA 4 – PERFIL DE SUSCETIBILIDADE À TIGECICLINA PELOS MÉTODOS DE DISCO DIFUSÃO E DILUIÇÃO EM ÁGAR DAS 227 AMOSTRAS DE *A. baumannii* MR ISOLADOS NO HC-UFPR SEGUNDO CRITÉRIOS DE USFDA E JONES, 2007

CRITÉRIO	MÉTODO	RESISTENTE n (%)	INTERMEDIÁRIO n (%)	SENSÍVEL n (%)
USFDA	DD	190 (83,7)	36 (15,9)	1 (0,4)
	AD	222 (97,8)	5 (2,2)	0 (0)
JONES	DD	123 (54,2)	90 (39,6)	14 (6,2)

LEGENDA: Disco difusão (DD); Ágar diluição (AD) segundo CLSI, 2006

NOTA: *Food and Drug Administration* (U.S.FDA)
Jones, 2007

Seguindo-se os critérios propostos para a tigeciclina por U.S.FDA, no método de disco difusão apenas um isolado foi sensível, 36 intermediários e 190 resistentes, enquanto que pelo método de ágar diluição foram distribuídos cinco isolados na categoria de intermediário e 222 resistentes.

A suscetibilidade encontrada para ampicilina/sulbactam entre as amostras de *A. baumannii* MR, determinada pelo método de disco difusão, foi de 4%, o que correspondia à nove isolados. Quarenta e oito isolados foram intermediários (21,1%) e 170 resistentes (74,9%). No intuito de observar a validade do uso do método de disco difusão na rotina laboratorial, os resultados foram comparados aos determinados pelo método de ágar diluição por Luiz (2006). Neste 5 amostras apresentaram CIM de 16/8 µg/ml e 222 amostras CIM ≥ 32/16 µg/ml. Os dados foram plotados num gráfico, onde, no eixo das abscissas (X) encontram-se os diâmetros dos halos de inibição do disco de ampicilina-sulbactam fornecidos pelo teste de disco difusão e, no eixo das ordenadas (Y), os valores de CIM, determinados pelo teste de ágar diluição (figura 3).

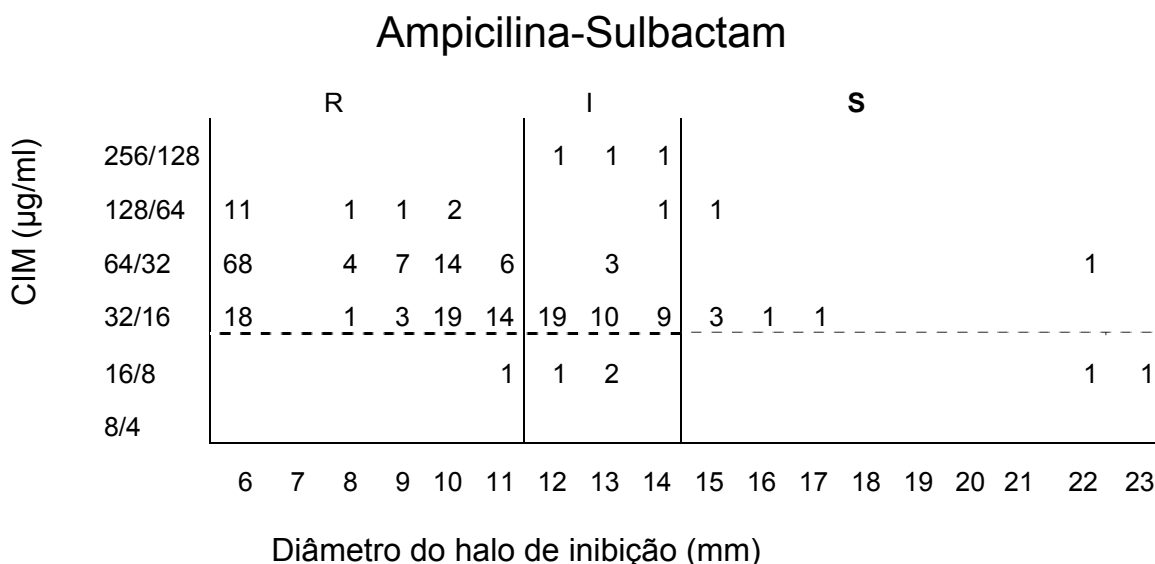


FIGURA 3 – COMPARAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM mm COM A CIM EM µg/ml DA AMPICILINA-SULBACTAM FRENTE AOS ISOLADOS DE *A. baumannii*

LEGENDA: Resistente (R); Intermediário (I); Sensível (S)

NOTA: As linhas contínuas representam os valores de ponto de corte para o teste de disco difusão, enquanto que a linha pontilhada o ponto de corte do método de ágar diluição. Os números indicam a quantidade de isolados observados em cada ponto.

Na figura 3 pode-se observar 9 amostras sensíveis pelo teste de disco difusão, dentre as quais 2 com CIM de 16/8 µg/ml (intermediário), e 7 com CIM ≥32/16 µg/ml, consideradas resistentes. Quarenta e oito amostras apresentaram sensibilidade intermediária no teste de disco difusão, sendo 3 também no teste de ágar diluição e 45 resistentes. As 168 amostras restantes foram resistentes em ambos os testes, exceto uma que apresentou CIM de 16/8 µg/ml.

4.2 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE METALO- β -LACTAMASE

Os resultados dos testes de confirmação da presença de M β L por métodos fenotípicos utilizando 40 amostras de *A. baumannii* M β L foram diferentes entre si em grande parte dos testes (tabela 5). O teste de duplo-disco difusão (TDDD) utilizando CAZ/MPA apresentou 4 resultados positivos, assim como o disco combinado (DC) de IPM + EDTA. O TDDD com IPM/EDTA obteve 23 resultados positivos, o DC de MEM + EDTA 35 positivos e, por último, o Etest M β L apresentou 27 resultados positivos. No entanto, entre as 40 amostras testadas apenas a número 82 foi confirmada por PCR como produtora de M β L (figura 4).

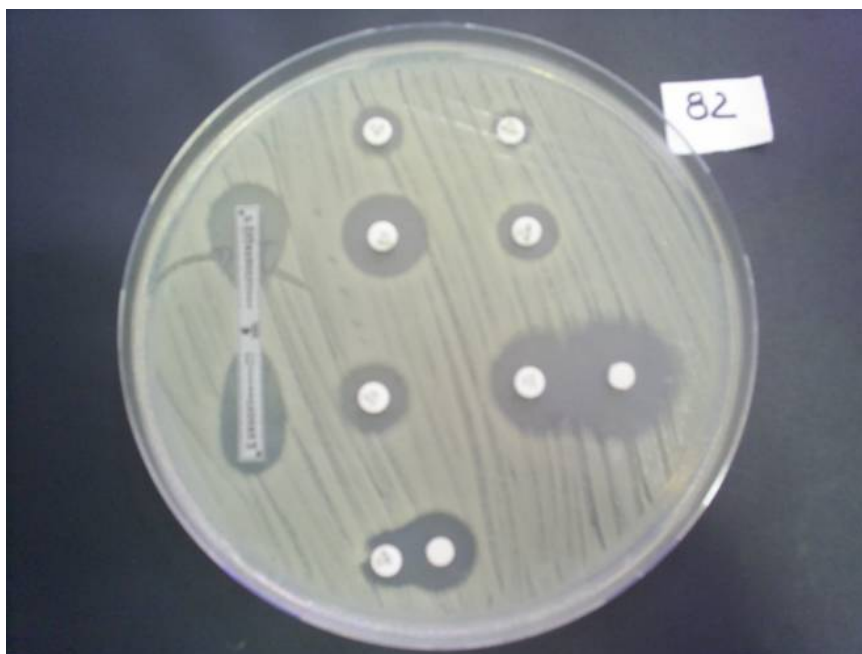


FIGURA 4 – EXEMPLO DE TESTES DE TRIAGEM POSITIVOS PARA DETECÇÃO DE M β L EM AMOSTRA DE *A. baumannii* ISOLADA NO HC-UFPR

TABELA 5 – RESULTADOS DOS DIVERSOS MÉTODOS DE DETECÇÃO FENOTÍPICA DE PRESENÇA DE M β L EM 40 AMOSTRAS *A. baumannii* ISOLADAS DO HC–UFPR POSITIVAS PELO TDDD E 39 NEGATIVAS POR PCR

AMOSTRA	TDDD		DC		E-TEST
	CAZ/MPA	IPM/EDTA	IPM/EDTA	MEM/EDTA	
24	N	P	N	P	P
36	N	P	N	P	N
48	N	P	N	P	P
55	N	P	N	P	P
56	N	P	N	P	P
69	N	P	N	N	P
74	N	P	N	P	N
75	N	N	N	P	P
77	N	N	N	P	P
80	N	P	N	P	P
82	P	P	P	N	P
90	N	P	N	P	P
92	N	N	N	P	P
94	N	N	N	P	P
95	N	N	N	P	P
97	N	N	N	P	P
98	N	N	P	N	P
102	N	P	N	P	P
104	N	N	N	N	P
131	N	N	P	P	P
134	N	P	N	P	N
135	N	N	N	N	N
138	N	P	N	P	P
140	N	P	N	P	P
143	N	N	N	P	N
144	N	P	N	P	N
146	P	P	N	P	N
147	P	P	N	P	N
150	N	P	N	P	P
156	N	N	N	P	P
165	N	P	N	P	N
170	N	N	N	P	P
172	N	N	N	P	P
181	N	N	P	P	P
183	N	N	N	P	P
189	N	P	N	P	N
199	N	P	N	P	N
200	N	P	N	P	N
201	P	P	N	P	N
203	N	N	N	P	P
Positivas	4	23	4	35	23

NOTA: CAZ – ceftazidima; MPA - ácido 2-mercaptopropiônico; IPM – imipenem; EDTA – ácido etilenoaminotetracético; MEM - meropenem.

LEGENDA: Positivo (P); Negativo (N).

O teste de disco combinado IPM/IPM+ EDTA foi o escolhido para ser testado com todas as amostras de *A. baumannii* MR estudadas (figura 5).



FIGURA 5 – EXEMPLO DE TESTE DE DISCO COMBINADO POSITIVO COM IPM /IPM+EDTA EM AMOSTRA DE *A. baumannii* ISOLADA DO HC-UFPR

Segundo o critério de positividade do aumento do halo IPM+EDTA em relação ao IPM ≥ 7 mm, 34 isolados foram positivos. Porém, se considerado o diâmetro do halo de inibição IPM+EDTA ≥ 17 mm, somente 3 dos 34 seriam positivos. Os resultados obtidos foram plotados num gráfico, onde, no eixo das abscissas (X) encontram-se os diâmetros dos halos de inibição do IPM + EDTA e, no eixo das ordenadas (Y), o aumento dos halos de inibição do IPM+EDTA em relação ao disco de IPM (figura 6).

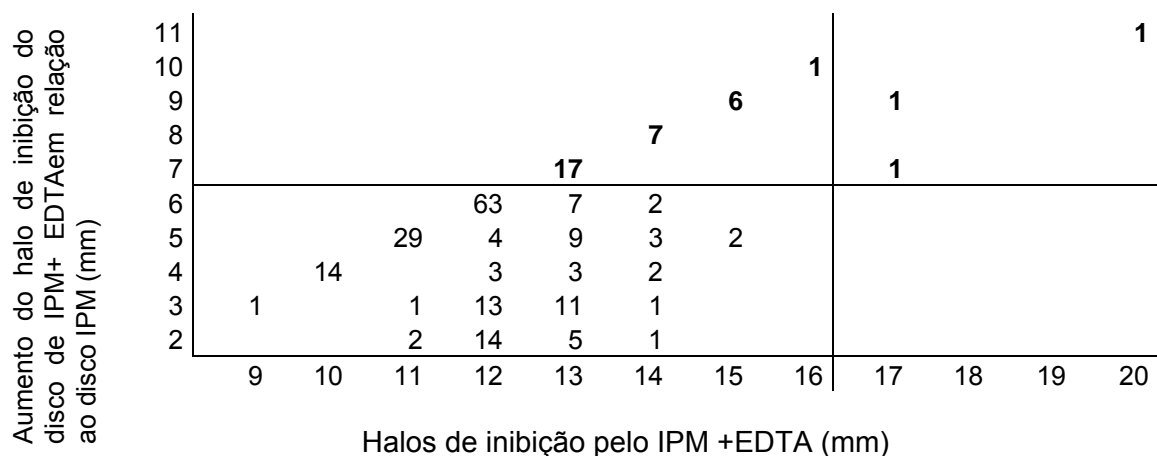


FIGURA 6 – COMPARAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO COM O AUMENTO DO HALO DE INIBIÇÃO EM mm PRODUZIDOS PELO DISCO DE IMIPENEM + EDTA EM ISOLADOS DE *A. baumannii*

NOTA: As linhas contínuas representam os valores de ponto de corte propostos por YONG, 2002. Os números em negrito indicam os isolados M β L positivos.

4.3 DETERMINAÇÃO GENOTÍPICA DE METALO- β -LACTAMASE

Dentre os 34 isolados analisados, apenas uma amostra e o controle apresentaram produto de PCR compatível ao fragmento amplificado do gene *bla*_{IMP-1}, com 587 pb (figura 7). Entre as demais amostras testadas não houve produto de amplificação de PCR compatível com o fragmento amplificado do gene *bla*_{SPM-1}. No entanto as 33 amostras restantes, cujo resultado fenotípico positivo para M β L não foi confirmado, haviam apresentado produto de PCR compatível ao fragmento amplificado pelo gene *bla*_{OXA-23} (501pb).

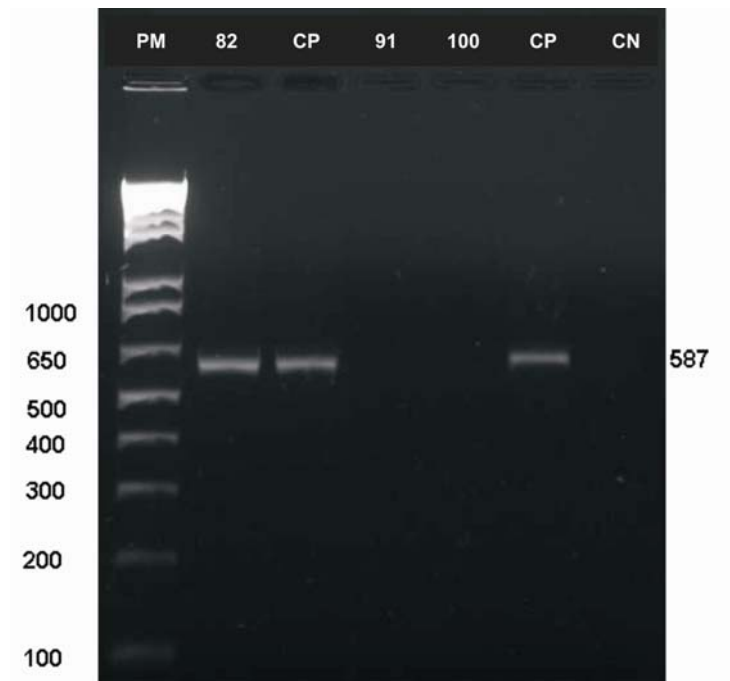


FIGURA 7 - PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE *bla*_{IMP-1} OBTIDO DO ISOLADO DE *A. baumannii* M β L POSITIVO

LEGENDA: Marcador de peso molecular (PM), *A. baumannii* produtor de IMP-1(82), controle positivo (CP), controle negativo (CN), amostras negativas (91 e 100)

A amostra produtora de M β L tipo IMP foi isolada de aspirado traqueal, coletado de um paciente da UTI-Ad. em 17/11/2003. O isolado de *A. baumannii* apresentou suscetibilidade à amicacina, piperacilina-tazobactam e polimixina, sensibilidade intermediária ao impenem e resistência à gentamicina, ampicilina-sulbactam, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacina, meropenem e sulfametoxazol-trimetoprim.

4.4 RESULTADOS DA ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO

As amostras de *A. baumannii* MR foram classificadas, segundo os critérios de Tenover *et al.* (1995), em 8 perfis eletroforéticos distintos, os quais foram nominados de A a H e subdivididos em 31 subtipos diferentes (tabela 7). Os perfis A, C e F ocorreram em maior quantidade e apresentaram vários subtipos diferentes (figura 8). Os perfis nomeados como B, D e E corresponderam a 5 isolados sensíveis aos carbapenêmicos. Os perfis encontrados em cada amostra estão no ANEXO 2.

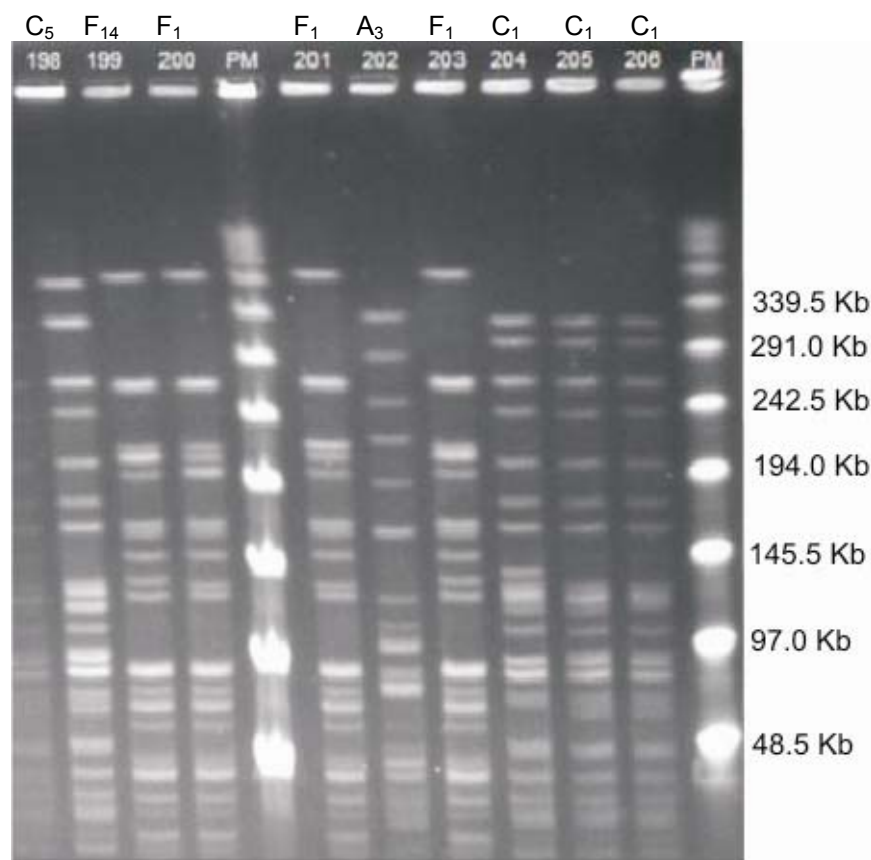


FIGURA 8 – PERFIS ELETROFORÉTICOS DE PFGE ENCONTRADOS EM AMOSTRAS DE *A.baumannii* MR ISOLADAS NO HC-UFPR

NOTA: PM – marcador de peso molecular (Lambda Ladder) isolados 199, 200, 201 e 203 – perfil F; 202 – perfil A; 198, 204, 205, 206 – perfil C;

TABELA 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS DE *A. baumannii* ESTUDADOS NOS DIFERENTES PERFIS ELÉTROFERÉTICOS E SUBTIPOS ENCONTRADOS EM PFGE POR Apal

PERFIL	SUBTIPOS	NÚMERO DE ISOLADOS (%)
A	A ₁ a A ₃	36 (15,86)
B	B ₁ a B ₃	3 (1,32)
C	C ₁ a C ₆	85 (37,5)
D	D	1 (0,44)
E	E	1 (0,44)
F	F ₁ a F ₁₅	97 (42,7)
G	G	3 (1,32)
H	H	1 (0,44)
TOTAL	31	227 (100)

A distribuição temporal dos perfis A, C e F encontrados entre as amostras de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos permitiu observar que os mesmos foram encontrados isoladamente e/ou simultaneamente em períodos distintos do estudo (figura 9).

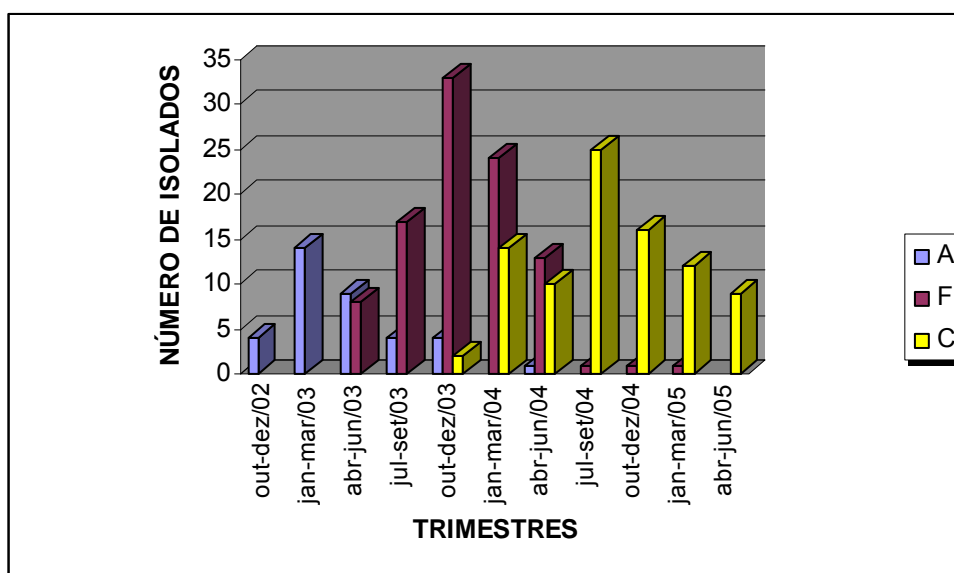


FIGURA 9 – DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DOS PERFIS DE RESISTÊNCIA A, C e F ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DE *A. baumannii* ISOLADAS NO HC-UFPR

LEGENDA: Perfil A (A); Perfil F (F); Perfil C (C).

O perfil A₁ encontrado nos primeiros isolados de *A. baumannii* MR do presente estudo foi comparado com o perfil do trabalho de Dalla Costa *et al.* (2003), onde pôde-se observar que são idênticos ou altamente relacionados (figura 10).

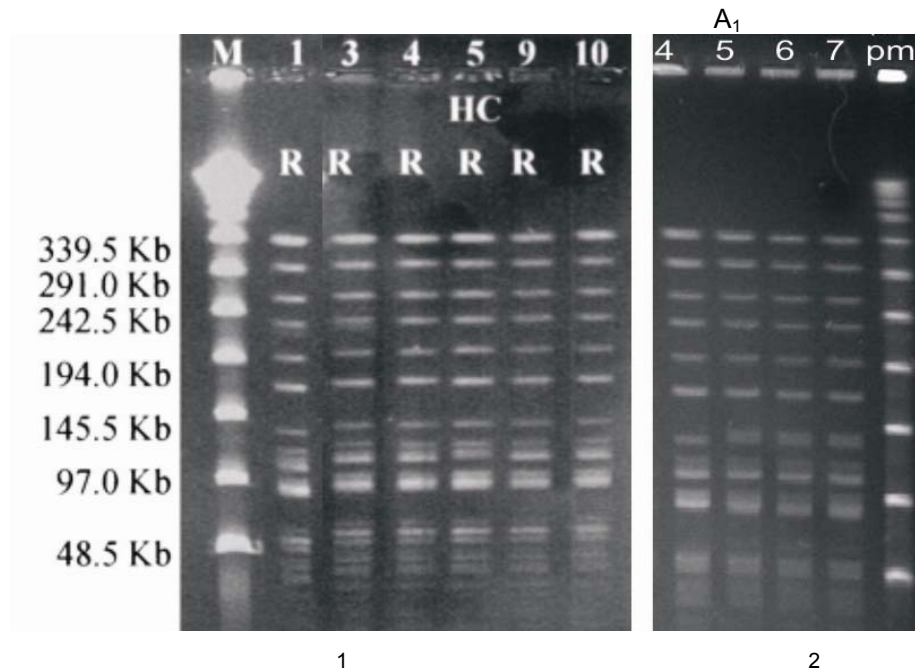


FIGURA 10 – COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE PFGE UTILIZANDO ApaI DE ISOLADOS DE *A. baumannii* DESTE ESTUDO (4,5,6,7) COM O DESCRITO POR Dalla Costa *et al.* (2003).

NOTA: M – marcador de peso molecular (kb), R – isolados resistentes aos carbapenêmicos

FONTE: 1 Dalla Costa *et al.* (2003);

2 O AUTOR

Foram coletados múltiplos isolados em 37 pacientes, sendo observados perfis idênticos em 28 destes. Em 6 pacientes houve subtipos diferentes do clone F e perfis diferentes em 3 pacientes. Não houve distinção dos tipos de perfis encontrados entre as unidades de internação, bem como entre os diferentes materiais coletados.

Analisando os géis de PFGE de todas as amostras de *A. baumannii* estudadas pelos programas Gel Pro-Analyzer e NTSYS, construiu-se um dendrograma de similaridade baseado no polimorfismo dos fragmentos de restrição. As amostras com perfil idêntico foram agrupadas a fim de permitir uma melhor visualização de todos os subtipos encontrados (figura 11).

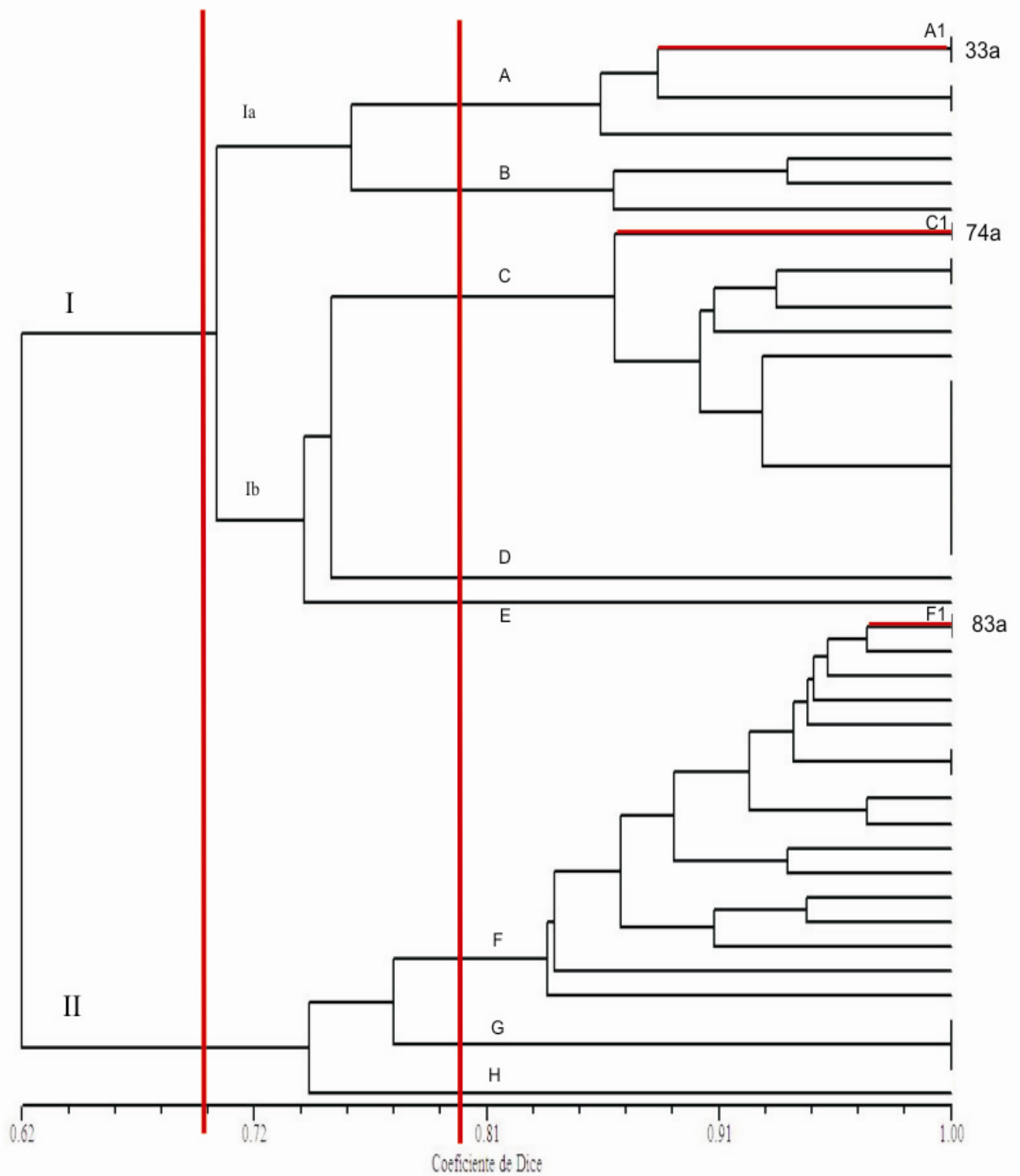


FIGURA 11 - DENDROGRAMA CONFECCIONADO COM BASE NO POLIMORFISMO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO EM PFGE UTILIZANDO A ENZIMA *Apal* DE 227 ISOLADOS DE *A. baumannii*

NOTA: I e II – grupos; Ia e Ib – subgrupos; A,B,C,D,E,F,G,H – perfis eletroforéticos; A₁ – genótipo com 33 amostras; C₁- genótipo com 74 amostras; F₁ – genótipo com 89 amostras
As linhas verticais indicam os índices de 70% e 80% do Coeficiente de Dice.

O coeficiente de similaridade de 80% definiu perfis semelhantes aos obtidos segundo os critérios de Tenover para os isolados estudados. Entretanto, observando o coeficiente de similaridade de 70%, a análise do dendrograma nos permite visualizar a formação de dois grandes grupos. O Grupo I dividido em 2 subgrupos: Ia constituído pelos perfis A e B, reúne 6 subtipos e 39 isolados, sendo 33 isolados idênticos com o subtipo A₁. O subgrupo Ib constituído pelos perfis C, D e E, reúne 8 subtipos e 87 isolados, sendo 74 isolados idênticos com o subtipo C₁. O Grupo II formado pelos perfis F, G e H, com 17 subtipos e 101 isolados, sendo que no subtipo F₁ são agrupados 83 isolados idênticos (tabela 7).

TABELA 7 – ANÁLISE DO DENDROGRAMA OBTIDO SOB COEFICIENTE DE DICE DE 70% DOS 227 ISOLADOS DE *A. baumannii* MR ESTUDADOS

GRUPO	SUBGRUPO	PERFIS	SUBTIPOS	NÚMERO DE ISOLADOS
I	Ia	A e B	6	39
	Ib	C, D e E	8	87
II		F, G e H	17	101

5 DISCUSSÃO

5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Inúmeros estudos têm sido realizados no intuito de compreender os múltiplos mecanismos de resistência aos antimicrobianos de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*. Neste trabalho foram estudados 227 isolados de *A. baumannii* previamente selecionados por serem multirresistentes com base nos resultados de concentração inibitória mínima frente a doze antimicrobianos. Estes isolados apresentaram altos níveis de resistência aos carbapenêmicos, sendo 97,4% resistentes ao meropenem e 97,8% ao imipenem, dados que motivaram o estudo. Polimixina B foi o único antimicrobiano para o qual houve maior percentagem de suscetibilidade (98,7%). Porém, dados do estudo MYSTIC sobre a suscetibilidade antimicrobiana em UTI de sete grandes centros brasileiros relataram um perfil de resistência ao imipenem do *A. baumannii* de apenas 10,4% em 2002 (MENDES *et al.*, 2005).

Os dados do programa SENTRY mostram que a resistência dos patógenos nosocomiais gram-negativos, incluindo *A. baumannii* são maiores na América Latina do que nos Estados Unidos ou Europa. A prevalência da resistência aos carbapenêmicos em isolados de *A. baumannii* na América Latina em 2001 foi estimada em 25%. Em 2005 os níveis de resistência do *A. baumannii* aos carbapenêmicos foi cerca de 40% em 12 hospitais da Colômbia (VILLEGAS *et al.*, 2007). No entanto, amostras de *Acinetobacter spp.* isoladas de hospitais norte-americanos apresentaram sensibilidade de 81,8% ao imipenem e resistência de 56,6% ao cefepime, 40,3% à ceftazidima, 69,3% à gentamicina, 83,4% à ciprofloxacina (PFALLER *et al.*, 2006).

No presente estudo a unidade clínica do Hospital de Clínicas de UFPR com a maior frequência de isolamentos foi a UTI-adulto (60%), em concordância com os dados da literatura (NAAS *et al.*, 2005; OTEO *et al.*, 2007). Nas amostras provenientes de pacientes das UTIs, o principal sítio de ocorrência de *A. baumannii* foi o trato respiratório inferior (54%), geralmente causando pneumonias associadas à ventilação mecânica (VAP). Na seqüência foram isolados de sangue (20%), cateter e urina (8%). Em contrapartida, no estudo MYSTIC, sangue e cateter aparecem em primeiro lugar com 39,2% dos isolados, o trato respiratório em segundo com 25,7% e o trato urinário com 16,7% (MENDES *et al.*, 2005).

5.2 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS - TIGECICLINA E AMPICILINA-SULOBACTAM

A crescente prevalência de isolados de *A. baumannii* MR reforça a necessidade de desenvolvimento de drogas alternativas para o tratamento de infecções causadas por este microrganismo. Neste contexto, o lançamento da Tigeciclina, antimicrobiano da classe das glicilciclinas, tem sido uma grande esperança no tratamento dessas infecções. No presente trabalho foram realizados os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos pelos métodos de disco difusão e ágar diluição das amostras de *A. baumannii* MR frente à tigeciclina, no intuito de conhecer o perfil de atividade deste antimicrobiano frente aos isolados bacterianos. A tigeciclina não possui os valores de corte de resistência definidos pelo CLSI, portanto, foram considerados neste estudo os valores publicados por U.S.FDA, além dos propostos por Jones *et al.* (2007).

Assim, no presente estudo a sensibilidade das amostras de *A. baumannii* à tigeciclina pelo teste de disco difusão foi extremamente baixa (0,4%) segundo o valor de corte ≥ 19 mm proposto por U.S.FDA. Quando considerado o valor de sensibilidade ≥ 16 mm proposto por Jones *et al.* (2007), a taxa de sensibilidade à tigeciclina dos isolados analisados neste estudo aumenta para 6,2%.

Comparando os resultados do teste de disco difusão com o CIM por diluição em caldo da tigeciclina para o *A. baumannii*, Jones *et al.* (2007) sugerem que os valores de corte para enterobactérias sejam alterados para o *Acinetobacter* spp. para ≥ 16 mm como sensível e ≤ 12 mm como resistente, a fim de reduzir a taxa de erro entre os métodos a níveis aceitáveis de 9,7%.

Devido à impossibilidade de adquirir o sal da tigeciclina para realizar os experimentos, o medicamento Tygacil® foi utilizado no teste de ágar diluição para a determinação da concentração inibitória mínima, o qual foi diluído em água esterilizada, conforme já realizado em outros estudos (PELEG *et al.*, 2007).

É importante salientar que no presente estudo os valores de CIM foram determinados pelo método de ágar diluição, pois é conhecido que os valores obtidos pelo método da diluição em caldo apresentam resultados de uma ou duas diluições mais altos.

A CIM para a tigeciclina encontrada no presente trabalho foi elevada, em concordância com os resultados do teste de disco difusão. Os valores de CIM₅₀ e

CIM₉₀ determinados foram de 16 µg/ml e a resistência entre os isolados de *A. baumannii* MR foi de 100%.

Os resultados de suscetibilidade à tigeciclina pelos métodos de disco difusão e ágar diluição obtidos no presente estudo apresentaram alguns resultados discordantes com os critérios propostos por U.S.FDA. No método de disco difusão 0,4% (1/227) das amostras foram sensíveis, 15,9% (36/227) intermediárias e 83,7% (190/227) resistentes; porém, pelo método de ágar diluição 2,2% das amostras apresentaram sensibilidade intermediária e 97,8% foram resistentes. As discrepâncias aumentam ainda mais se considerados os valores propostos por Jones *et al.* (2007) para o teste de disco difusão, uma vez que seriam consideradas sensíveis 6,4% (14/227), intermediárias 39,6% (90/227) e resistentes somente 54,2% (123/227) das amostras.

Segundo Betriu *et al.* (2006) a atividade da tigeciclina é afetada pela quantidade de oxigênio dissolvida no meio. Foram comparados os resultados dos testes realizados com placas preparadas no dia da inoculação com dados de estudos anteriores, onde os meios foram preparados 24 a 48 h antes do uso. Nos estudos em que os meios foram preparados no mesmo dia a taxa de resistência à tigeciclina foi menor do que nos estudos onde as placas haviam sido preparadas mais de 24 hs antes da inoculação. Assim, em meios frescos a tigeciclina apresentou valores de CIM menores do que em meios velhos (BETRIU *et al.*, 2006).

No entanto, segundo Hope *et al.* (2005), os valores de CIM determinados pelo método de ágar diluição em isolados resistentes não seriam afetados pelo tempo, o que ocorre quando realizado em meio em caldo e em isolados sensíveis. As placas usadas no presente estudo foram preparadas com 24 a 72 horas antes do uso, o que poderia ter levado a valores mais elevados de CIM, conforme Betriu *et al.* (2006).

Os primeiros estudos nos Estados Unidos usando tigeciclina demonstravam sensibilidade do *A. baumannii*, com resultados de CIM₉₀ de 1 µg/ml e CIM₅₀ de 0,5 µg/ml. (HOBAN *et al.*, 2005). Estudos posteriores apresentaram resultados de CIM₉₀ da tigeciclina contra *A. baumannii* de 2 µg/ml. Entre estes isolados a resistência ao imipenem foi de 38,3 à ceftazidima de 97,5%, e ao cefepime de 82,3% (HOBAN *et al.*, 2007).

Estudo realizado em 20 centros hospitalares na Espanha, em 2005, para avaliação da atividade da tigeciclina contra uma variedade de microrganismos,

obteve para *A. baumannii* CIM₅₀ da tigeciclina de 4µg/ml e CIM₉₀ de 8µg/ml. Entre as 57 amostras de *A. baumannii* estudadas, 18 eram resistentes ao imipenem (BETRIU *et al.*, 2006).

Em estudos recentes foi detectada resistência à tigeciclina utilizando discos, Etest® e CIM. Os isolados de *Acinetobacter* spp. MR tiveram CIM elevados (8 a >256mg/l), sendo observados valores mais altos nos isolados resistentes aos carbapenêmicos. Venezia *et al.* (2007) também encontraram em isolados de *A. baumannii* MR altos níveis de resistência à tigeciclina. A CIM₅₀ e CIM₉₀ foram 16 e 32 mg/l, dentro de uma variação de 1 a 128 mg/l (IREDELL *et al.*, 2007; VENEZIA *et al.*, 2007).

Nenhum dos isolados de *A. baumannii* testados no presente trabalho apresentou CIM baixo o suficiente para sugerir o uso clínico da tigeciclina. Isto é desanimador porque a tigeciclina seria uma opção de tratamento para os isolados multirresistentes que possuem poucas opções terapêuticas.

Em relação à associação ampicilina/sulbactam, o CLSI (2006), não recomenda o teste de disco difusão para a ampicilina/sulbactam. O Etest é de alto custo e a realização de testes dilucionais para determinação da CIM são trabalhosos e inviáveis para os laboratórios clínicos. Foi realizada neste estudo a comparação entre os resultados dos métodos de ágar diluição e disco difusão para observar se havia discrepância entre os métodos. O método de disco difusão detectou 4% das amostras resistentes como sensíveis e 22% das amostras resistentes como intermediárias, uma vez que no método de ágar diluição 100% foi resistente. Conclui-se que houve discrepância entre os métodos, não recomendando o método de disco difusão, conforme o CLSI (2006).

5.3 DETECÇÃO DE METALO-β-LACTAMASES

No presente estudo foram avaliadas as principais técnicas descritas para a detecção fenotípica de MβL em isolados clínicos de *A. baumannii* com o objetivo de verificar sua acurácia em comparação com a técnica de PCR. Como os testes fenotípicos para detecção de MβL em *A. baumannii* apresentam resultados conflitantes e pouco reprodutíveis, realizamos no presente trabalho uma análise comparativa entre várias metodologias e substratos empregados.

Os testes realizados com as 40 amostras de *A. baumannii* previamente caracterizadas como positivas no teste de duplo-disco difusão (TDDD) não apresentaram a reprodutibilidade esperada e quando comparados entre si os mesmos foram diferentes para uma mesma amostra.

O TDDD utilizando MPA/CAZ detectou no presente estudo 4 amostras como positivas, dentre estas a amostra produtora de M β L e 3 falsos positivos. Quando comparado aos resultados anteriores onde os 40 isolados haviam sido positivos neste teste, observou-se que não houve reprodutibilidade. Isto pode ser devido à subjetividade na interpretação do teste. Empregando a mesma metodologia, TDDD com IPM/ EDTA, 22 amostras foram positivas, sendo somente 1 confirmada na PCR.

O TDDD pode apresentar boa sensibilidade e especificidade, porém estes resultados podem variar com a espécie bacteriana, substrato e agente quelante utilizado. Em estudo realizado por Arakawa *et al.* (2000), o agente quelante 2-MPA apresentou melhor sensibilidade quando comparado aos demais agentes utilizados na detecção de amostras produtoras de M β L utilizando-se CAZ como substrato. Lee *et al.* (2003) demonstraram que o 2-MPA apresentou melhor sensibilidade na detecção de amostras de *Acinetobacter* spp. M β L positivas, mas falhou ao detectar 10,5% das amostras de *Pseudomonas* spp. No entanto, o EDTA obteve melhor detecção das amostras de *P. aeruginosa*, mas falhou em detectar 6% das amostras de *Acinetobacter* spp.

O TDDD utilizando IPM a 20 mm do EDTA teve sensibilidade de 79% e especificidade de 98%, nos estudos feitos por Franklin *et al.* (2006) com 84 isolados de bacilos gram-negativos, entre eles enterobactérias, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., produtores de M β L, resistentes e sensíveis aos carbapenêmicos. A metodologia de disco combinado (DC) IPM/EDTA apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 98%.

Oh *et al.* (2003) pesquisaram a prevalência de M β L em 99 isolados de *P. aeruginosa* e 31 de *A. baumannii* com reduzida suscetibilidade a imipenem e ceftazidima. Comparativamente foram feitos os testes fenotípicos de DC utilizando IP/IPM+EDTA e CAZ/CAZ+2MPA e TDDD utilizando CAZ-2MPA e IPM-EDTA. O DC utilizando IPM/IPM+EDTA apresentou sensibilidade de 88,6% e especificidade de 98,9%, sendo mais claramente discriminados os resultados positivos e negativos.

Segundo Pitout *et al.* (2005) o TDDD é subjetivo e de difícil interpretação, além do 2-MPA ser tóxico ele requer precauções especiais para a sua utilização,

sendo assim inconveniente na rotina laboratorial. O Etest® M β L além de ter alto custo pode apresentar resultados variáveis. Em estudos realizados para a pesquisa de M β L o DC utilizando MEM e IPM com EDTA apresentou 100% e 97% de sensibilidade e 96% e 91% de especificidade, quando comparados aos resultados da PCR.

O DC utilizando imipenem acrescido de 5 μ l de EDTA 0,5 M detectou, entre as 40 amostras testadas, 4 amostras como positivas, sendo a amostra produtora de M β L e 3 falso-positivos. Esta foi considerada a melhor técnica por ser de fácil execução e de fácil leitura, não apresentando subjetividade como os testes de duplo-disco difusão, conforme observado por Oh *et al.* (2003) e Pitout *et al.* (2005). Posteriormente, o teste de DC foi utilizado na pesquisa de M β L em todas as amostras, onde 15% (34/227) das amostras foram positivas. Entretanto, se considerado o aumento do halo de inibição IPM+EDTA \geq 17 mm, somente 3 dentre as 34 amostras foram positivas, das quais uma apresentou produto compatível com o gene *bla*_{IMP-1}.

A utilização da metodologia acima, empregando meropenem acrescido de EDTA não obteve bons resultados para os isolados de *A. baumannii*, uma vez que não detectou o isolado produtor de IMP, bem como teve 35 resultados falso-positivos.

Segundo Yong *et al.* (2002) o DC usando IPM/EDTA é simples e apresenta alta sensibilidade para a diferenciação de isolados produtores de M β L. O critério de interpretação que utiliza como ponto de corte o aumento do halo IPM+EDTA em relação ao IPM \geq 7mm em testes com 102 isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* produtores de M β L, obteve sensibilidade de 95,7% e especificidade de 91,0%. A leitura do diâmetro do halo de inibição IPM+EDTA foi útil para resolução do problema dos resultados duvidosos. Assim, para *Acinetobacter* spp. foi considerada a zona de inibição de IPM+EDTA \leq 14mm como M β L-negativos, e quando for \geq 17mm como M β L-positivos.

No presente estudo o Etest® M β L apresentou desempenho insatisfatório na detecção de M β L dos isolados de *A. baumannii* testados, onde obteve 26 resultados falso-positivos, concordando com o estudo feito por Segal e Elisha (2005) onde 49 isolados de *A. baumannii* resistentes a imipenem seriam considerados produtores de M β L pelo Etest® M β L. No entanto, nenhum dos isolados apresentou produto de PCR compatível com os genes *bla*_{IMP-1} e *bla*_{VIM-2} pesquisados, mas os 49 isolados

apresentaram produto compatível com gene *bla*_{OXA-23}. A presença da OXA-23 é provavelmente um interferente no teste Etest® M β L, gerando resultados falso-positivos.

No presente trabalho utilizou-se a técnica de PCR para confirmação da pesquisa de M β L por testes fenotípicos. A presença de IMP foi detectada em apenas uma dentre as 227 amostras estudadas, sendo a amostra positiva na PCR uma das três que apresentaram resultado positivo no teste do disco combinado (DC) IPM/IPM+EDTA. Não foram observados genes relacionados a enzimas do tipo SPM neste estudo, bem como VIM-1 e VIM-2 pesquisados no estudo realizado anteriormente por Luiz em 2006.

No presente estudo, entre os 227 isolados de *A. baumannii* MR estudados, apenas 1 apresentou M β L do tipo IMP, o que corresponde à prevalência de 0,44%. Embora as M β L sejam mais freqüentes e estudadas em isolados de *P. aeruginosa*, Tognim *et al.* (2006) relataram a prevalência de 54% (40/78) de IMP-1 em amostras de *A. baumannii* isoladas de pacientes internados no Hospital São Paulo, no período de maio de 1993 a novembro de 2001, sendo verificada a presença de IMP-1 a partir de 1998.

O isolado identificado como produtor de IMP apresentou suscetibilidade à amicacina, piperacilina-tazobactam e polimixina, sensibilidade intermediária ao imipenem e resistência à gentamicina, ampicilina-sulbactam, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacina, meropenem e sulfametoxazol-trimetoprim. Oh *et al.* (2003) encontraram isolados de *A. baumannii* produtores de M β L sensíveis ao imipenem. Geralmente os isolados produtores de M β L são resistentes à ceftazidima (MIC >64 μ g/ml), enquanto a suscetibilidade aos carbapenêmicos pode ser variada. Este fato sugere que deve ser pesquisada a produção de M β L em isolados com baixos níveis de resistência aos carbapenêmicos e ceftazidima (OH *et al.*, 2003; YAN *et al.*, 2001).

A totalidade dos isolados resistentes aos carbapenêmicos incluídos no presente estudo apresentaram a enzima OXA-23. Entretanto, sabe-se que a eficiência hidrolítica das oxacilinases contra os carbapenêmicos é fraca e menor que das M β L. Isto sugere que a resistência aos carbapenêmicos nestas amostras seja devido à presença de vários mecanismos de resistência, entre eles bombas de efluxo e alterações de PBP e porinas (FERNANDEZ-CUENCA *et al.*, 2003).

5.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *A. baumannii* MR

Para verificar a hipótese de clonalidade entre as amostras de *A. baumannii* MR produtoras de OXA-23 isoladas no HC-UFPR, as mesmas foram submetidas à análise de macro-restrição por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Esta técnica é baseada na digestão do cromossomo com enzimas de restrição, visto que o cromossomo é o componente fundamental de identificação da célula bacteriana. Esta metodologia de PFGE representa a medida preferencial para avaliar a interrelação entre isolados (SINGH *et al.*, 2006).

Os 227 isolados de *A. baumannii* MR do presente estudo foram classificados em 8 tipos de perfis diferentes e 31 subtipos eletroforéticos. Dentre estes houve o predomínio dos perfis A, C e F que corresponderam a 15,9%; 37,5% e 42,7% dos isolados, respectivamente.

Os primeiros casos de *A. baumannii* multirresistentes isolados no Hospital de Clínicas no final da década de 90 foram relatados por Dalla Costa *et al.* (2003). O trabalho mostrou que os cinco isolados resistentes aos carbapenêmicos apresentaram o gene *bla*_{OXA-23} e pertenciam a um mesmo clone, o qual era semelhante ao encontrado no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC).

O perfil A₁ encontrado nos primeiros isolados do presente estudo, coletados no último trimestre de 2002 e primeiro trimestre de 2003, foi idêntico ao perfil encontrado por Dalla Costa *et al.* (2003) nos isolados coletados em 1999. Este fato indica que houve a disseminação deste clone pelos diferentes setores do Hospital de Clínicas durante o ano de 2003.

Estudos foram realizados em outros países na América Latina, onde os perfis descritos são diferentes dos encontrados neste trabalho. A macro-restrição por Apal de 50 isolados de *A. baumannii* oriundos de cinco hospitais de Buenos Aires demonstrou 17 subtipos dentro de 5 perfis diferentes. Trinta e oito isolados eram resistentes a carbapenêmicos e foram classificados como perfil IV. Os isolados carbapenêmicos sensíveis eram dos perfis I, III, VIII e VI. A origem clonal comum de 21 dentre 24 isolados do clone IV, com padrões semelhantes de CIM e ampla capacidade de disseminação os caracterizaram como uma cepa epidêmica (BARBOLLA *et al.*, 2003). Villegas *et al.* (2007) descreveram como o primeiro surto de *A. baumannii* com carbapenemase OXA-23 na América Latina no estudo feito com 66 isolados de *A. baumannii* resistentes coletados em 7 hospitais da Colômbia

em 2005, onde foram confirmados a presença das carbapenemases OXA-23 e OXA-51. Os isolados foram genotipados por PFGE, sendo 45 isolados classificados em 4 clones e 21 tiveram perfis únicos.

Em um estudo feito com 24 isolados de *A. baumannii* coletados entre Março e Maio de 2004, em um hospital no Tahiti, observou-se que todos eram resistentes aos carbapenêmicos. Os mesmos produziam OXA-23 e pertenciam a um único clone, sugerindo uma situação endêmica (NAAS *et al.*, 2005).

Em estudo para determinar se o aumento de casos de *A. baumannii* ocorridos na UTI de um hospital universitário na Itália, durante dois períodos distintos, sendo ago/99 a fev/2001 e jan/02 a dez/02 foi devido ao mesmo clone epidêmico, 131 isolados foram genotipados através de PFGE por Apal. A análise genotípica dos isolados identificou 9 perfis diferentes, os quais foram identificados como A até I. Foram predominantes os perfis B, com 5 subtipos, e I, sendo estes encontrados nos períodos distintos do estudo. Os casos esporádicos dos perfis A, C, D, E, F e G apareceram no primeiro período, sendo somente o H no segundo período. Múltiplos isolados de um mesmo paciente mostraram sempre o mesmo perfil. (ZARILLI *et al.*, 2004).

Em sete hospitais da Espanha foram estudados 354 isolados de *A. baumannii* coletados entre Junho de 2003 e Junho de 2004. A maioria dos isolados era de pacientes da UTI 35,6 %, sendo trato respiratório 31,1%, seguido de trato urinário 19,8%. Os isolados resistentes a imipenem eram também mais resistentes aos outros antimicrobianos. Para definir a disseminação clonal 135 isolados oriundos de três hospitais foram submetidos a análise genética por PFGE. Um total de 34 perfis diferentes foi identificado, 115 isolados foram agrupados dentro de 14 grupos enquanto que 20 isolados remanescentes constituíam perfis únicos. Dentre os 14 grupos, 4 eram de isolados imipenem resistentes, 4 eram de isolados imipenem sensíveis e 6 tinham ambos. Não foi observado um clone imipenem resistente ou sensível comum entre os hospitais estudados. Os resultados sugerem que a aquisição da resistência ao imipenem em *A. baumannii* é devido à disseminação clonal e não-clonal, cada hospital pode ter características epidemiológicas com respeito às infecções por *A. baumannii* e resistência aos carbapenêmicos (OTEO *et al.*, 2007).

Em 12 cidades localizadas em 6 países da Europa foram pesquisados 47 isolados de *A. baumannii* e 1 isolado de *A. junii.*, dentre os quais 43 apresentaram

hidrólise do imipenem significativa. Foi feita pesquisa por PCR para os genes *bla*_{oxa-58}, *bla*_{oxa-23}, *bla*_{oxa-40}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}. A PCR para o gene *bla*_{oxa-23} foi positiva em 3 isolados e em 10 isolados para o gene *bla*_{oxa-40}. A PCR para o gene *bla*_{oxa-58} foi positiva em 23 isolados, os quais foram genotipados por PFGE. Foram identificados 11 perfis de PFGE, sendo o isolado de *A. junii* o perfil A e os isolados de *A. baumannii* os perfis B a K. Somente o perfil E foi encontrado em mais de um país, sendo França e Espanha (MARQUÉ *et al.*, 2005).

No presente estudo múltiplos isolados coletados do mesmo paciente apresentaram perfis idênticos em sua grande maioria. No entanto, foram também observados subtipos diferentes, bem como perfis diferentes a partir de isolados do mesmo paciente coletados em datas próximas.

Grande parte dos estudos realizados utiliza somente uma amostra de cada paciente. Entretanto, os estudos de culturas de vigilância feitos por Marchaim *et al.* (2007) encontraram, após genotipagem por PFGE, três perfis diferentes em 11 isolados provenientes de 5 pacientes. Estes foram iguais em sítios diferentes para um mesmo paciente, exceto um paciente, onde foram observados dois perfis, denominados como C o isolado da narina e D os isolados do reto e escarro. Marchaim *et al.* (2007) observaram ainda que a coleta de apenas uma cultura possui baixa sensibilidade (30%), e que quando coletados múltiplas amostras de vários locais, a sensibilidade para a detecção de colonizadores de *A. baumannii* MR pode chegar a 55%. No entanto, amostras múltiplas requerem tempo e custo, o que não é aplicável na rotina dos laboratórios clínicos. Foi também observado que o *A. baumannii* multirresistente pode ser encontrado como colonizante por longos períodos, até 42 meses, o que dificulta a abordagem terapêutica.

O presente estudo apresentou resultados semelhantes aos obtidos por Villegas *et al.* (2007) e Naas *et al.* (2005), sendo observada a prevalência dos isolados resistentes aos carbapenêmicos produtores de OXA-23 em um número restrito de perfis. Entretanto, os isolados sensíveis aos carbapenêmicos apresentaram maior variabilidade genética, conforme estudo realizado por Barbolla *et al.* (2003), sendo cinco isolados classificados em três perfis diferentes (B, D, E) e dois isolados classificados nos perfis resistentes A e F, semelhante ao observado por Oteo *et al.* (2007). Avaliando-se a distribuição temporal dos principais perfis encontrados entre os isolados de *A. baumannii* MR, somente o perfil A foi observado em out-dez/02 e jan-mar/03. A partir de abr-jun/03 observou-se a presença do perfil

F além do A. Posteriormente, em jul-set/03 observou-se a presença do perfil C e a diminuição do número de isolados com perfil A. Na seqüência, ocorreu a diminuição do número de isolados com o perfil F e o aumento do perfil C, sendo finalmente visto somente o perfil C em abr-jun/05.

A análise do dendrograma nos permite visualizar, quando considerado o coeficiente de similaridade de 70%, que os perfis A, B, C, D e E pertencem a um mesmo grupo. Mediante estas observações poderíamos supor que o perfil C seria proveniente de mudanças genéticas ocorridas no perfil A, uma vez que pertencem ao mesmo clone e o aparecimento do perfil C coincide com a diminuição do perfil A conforme pode ser observado na figura 9. Assim, dois grupos bem diferentes foram observados entre os isolados de *A. baumannii* estudados no presente trabalho, sendo denominados: grupo I com 126 isolados (55,5%) e grupo II com 101 isolados (44,5%).

PFGE é considerado padrão ouro na tipagem molecular. Desta forma, os dados encontrados no presente estudo não deixam dúvidas em relação à disseminação clonal de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos no HC-UFPR.

Este estudo demonstrou ainda que a principal forma de disseminação dos isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos no HC-UFPR foi a transmissão cruzada, pois somente três clones foram responsáveis por 96% dos isolados estudados. Este fato evidencia a necessidade de aprimorar as estratégias de controle de infecção, incluindo políticas para a utilização de antimicrobianos e isolamento dos pacientes com *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos.

6 CONCLUSÃO

- A análise genotípica por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) classificou os isolados de *A. baumannii* multirresistentes em 8 perfis e 31 subtipos diferentes, segundo os critérios de Tenover e análise de dendrograma com coeficiente de similaridade de 80%.
- A presença de apenas três clones sugere a transmissão cruzada como principal mecanismo de disseminação de *A.baumannii* MR produtor de OXA-23 nos diferentes setores do hospital.
- O teste de disco combinado utilizando IPM/IPM+EDTA apresentou os melhores resultados entre os métodos fenotípicos avaliados para pesquisa de M β L. No entanto, o elevado número de resultados falso positivos não permite a sua utilização como método de detecção.
- A determinação da Concentração Inibitória Mínima da Tigeciclina (CIM₅₀ e CIM₉₀ = 16 μ g/ml) e a resistência de 100% entre as amostras requerem confirmação por outras metodologias, bem como a pesquisa de bombas de efluxo como mecanismo de resistência em *A. baumannii*.
- A comparação entre os métodos de disco difusão e ágar diluição para ampicilina-sulbactam mostrou que há discrepâncias entre os métodos, não recomendando o método de disco difusão na prática laboratorial.
- Propõe-se a continuidade do estudo com um número maior de isolados produtores de M β L a fim de validar a metodologia fenotípica para pesquisa de M β L. A presença do gene bla_{IMP-1} em um isolado com baixo nível de resistência ao imipenem sugere a necessidade de pesquisa em outros isolados com este perfil de resistência.
- Os altos níveis de resistência aos carbapenêmicos são devidos a múltiplos mecanismos associados, os quais serão objetos de pesquisa na continuidade do estudo.

REFERÊNCIAS

- AFZAL-SHAH, M.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 2, p. 583-588, 2001.
- ARAKAWA, Y. *et al.* Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 40-43, 2000.
- BARBOLLA, R.E. *et al.* Identification of an epidemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain at hospitals in Buenos Aires city. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 45, p. 261-264, 2003.
- BASSETTI, M. *et al.* Colistin e rifampicin in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 2, p. 417-420, 2008.
- BERGONE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, n. 2, p. 148-165, 1996.
- BETRIU, C. *et al.* Antimicrobial activity of tigecycline against clinical isolates from Spanish medical centers. Second multicenter study. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 56, p. 437-444, 2006.
- BONOMO, R.A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis**, v. 43, S 49-56, 2006.
- BOU, G. *et al.* OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 6, p. 1556-1561, 2000.
- BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter Iwoffii*. **Int J Syst Bacteriol**, v. 36, n. 2, p. 228-240, 1986.
- BROWN, S. *et al.* Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, n. 1, p. 15-23, 2005.
- BUSH, K., JACOBY G. A., MEDEIROS A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.
- CASTANHEIRA, M. *et al.* Molecular characterization of a β -Lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n.12, p. 4654-4661, 2004.

CARRETO, E. *et al.* Use of the diversilab semiautomated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction for epidemiologic analysis on *Acinetobacter baumannii* isolates in different Italian hospitals. **Diag Microbiol Inf Dis**, v. 60, p. 1-7, 2008.

CERCENADO, E. Tigecycline: a new antimicrobial agent against multiresistant bacteria. **Therapy**, v. 4, n. 3, p. 255-270, 2007.

CHOI, C. H. *et al.* Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. **Cel Microbiol**, v. 7, n. 8, p. 1127-1138, 2005.

CISNEROS, J. M. *et al.* Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. **Clin Infect Dis**, v. 22, n. 6, p. 1026-1032, 1996.

CISNEROS, J. M.; BAÑO, J. R. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, n.11, p. 687-693, 2002.

CISNEROS, J. M. *et al.* Risk-factor for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 11, p. 874-879, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Fifteenth informational supplement. CLSI document M100-S15. Wayne, PA, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Sixteenth information supplement. CLSI document M100-S16. Wayne, PA,USA. 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for Antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved standard. Ninth edition. CLSI document M2-A9. Wayne, PA, USA, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically** Seventh edition. CLSI document M7-A7. Wayne, PA, USA, 2006.

CORBELLA, X. *et al.* Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis**, v. 23, n. 8, p. 329-334, 1996.

CORBELLA, X. *et al.* Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 42, n. 6, p. 793-802, 1998.

CORBELLA, X *et al.* Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 11, p. 4086-4095, 2000.

DALLA-COSTA, L. M. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 7, p. 3403-06, 2003.

Del MAR TOMAS, M. *et al.* Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, p. 540-546, 2005.

DIJKSHOORN, L. *et al.* Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, n. 4, p. 326-340, 2005.

DOAN, T. *et al.* Tigecycline: a glycylicycline antimicrobial agent. **Clin Therap**, v.28, n. 8, p. 1079-1106, 2006.

DONALD, H. M. *et al.* Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -Lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 1, p. 196-199, 2000.

DY, M. E. *et al.* The emergence of resistant strains of *Acinetobacter baumannii*: clinical and infection control implications. **Infect Control and Hosp Epidemiol**, v. 20, n. 8, p. 565-567, 1999.

ENOCH, D.A.; BIRKETT, C.I.; LUDLAM, H.A. Non-fermentative Gram-negative bacteria. **Int J Antimicrob Agents**, v.29 (supl 3), p. S33-41, 2007.

FALAGAS, M.E.; KOPTERIDES, P. Risk factor for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. **J Hosp Infect**, v. 64, p. 7-15, 2006.

FERNÁNDEZ-CUENCA, F. *et al.* Relationship between β -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 51, n.1, p.565-74, 2003.

FRANKLIN, C., LIOLIOS, L. and PELEG, A.Y. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 9, p. 3139-3144, 2006.

GALES, A.C. *et al.* Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 45, n. 1, p. 77-79, 2003.

GALES, A. C. *et al.* Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). **Clin Infect Dis**, v. 32 (Suppl.2), p. 104-13, 2001.

GERNER-SMIDT, P.; TJEMBERG, I.; URSING, J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 2, p. 277-282, 1991.

GRUNDMANN, H. *et al.* Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproductibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter spp.* **J Clin Microbiol**. v. 35, p. 3071-3077, 1997.

HÉRITIER, C. *et al.* Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 1, p. 268-273, 2003.

HOBAN, D.; BOUCHILLON, S.K.; DOWZICKY, M.J. Antimicrobial susceptibility of extended-spectrum β -lactamase producers and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* throughout the United States and comparative in vitro activity of tigecycline, a new glycylicycline antimicrobial. **Diagn Microbiol Inf Dis**, v. 57, p. 423-428, 2007.

HOBAN, D. J. *et al.* In vitro activity of tigecycline against 6792 gram-negative and gram-positive clinical isolates from the global Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program, 2004). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 52, n. 3, p. 215-227, 2005.

HOPE, R. *et al.* Effect of medium type, age and aeration on the MICs of tigecycline and classical tetracyclines. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 6, p.1042-1046, 2005.

IREDELL, J. *et al.* Tigecycline resistance in Australian antibiotic-resistant gram-negative bacteria. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n. 4, p. 816-818, 2007.

JAWAD, A. *et al.* Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry Surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 7, p. 1938-41, 1998.

JIN, W. *et al.* Comparative study of the inhibition of metallo- β -lactamases (IMP-1 and VIM-2) by thiol compounds that contain a hydrophobic group. **Biol Pharm Bull**, 27(6): 851-856, 2004.

JOLY-GUILLOU, M. L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clin Microbiol Infect Dis**, v. 11, p. 868-873, 2005.

JONES, R.N. *et al.* Multicenter studies of tigecycline disk difusi3n susceptibility results for *Acinetobacter spp.* **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 1, p. 227-230, 2007.

KOELEMAN, J. G. M. *et al.* Antibiotic resistance is a major risk factor for epidemic behavior of *Acinetobacter baumannii*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 22, n. 5, p. 284-88, 2001.

LEE, K. *et al.* Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of

Pseudomonas spp and *Acinetobacter spp*. **J Clin Microbiol**, v.41, n. 10, p. 4623-4629, 2003.

LEE, K. *et al.* Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 11, p. 4485-4491, 2005.

LEVIN, A. S. *et al.* Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis**, v. 28, n. 5, p. 1008-1011, 1999.

LEVIN, A. S. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, n. 11, p. 144-153, 2002.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Carbapenemases: a problem in waiting? **Curr Op in Microbiol**, v. 3, p. 489-495, 2000.

LIVERMORE, D. M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. **Clin Infect Dis**, v. 36 (Suppl 1), n. S11-23, 2003.

LUIZ, S.O. **Caracterização da resistência de amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas no Hospital de Clínicas de Curitiba**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identifications of medical bacteria**. 3th.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MARAGAKIS, L.L.; PERL,T.M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clin Infect Dis**, v. 46, p.1254-1263, 2008.

MARCHAIM, D. *et al.* Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 5, p. 1551-1555, 2007.

MARKOU, N.H. *et al.* Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. **Crit Care**, v. 7, p.78-83, 2003.

MARQUÉ, S. *et al.* Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter spp*. In Europe. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 9, p. 4885-4888, 2005.

MENDES, C. *et al.* Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 44-51, 2005.

MENDES, R. *et al.* Metallo- β -lactamases. **J Bras Patol Méd Lab**, v. 42, n.2, p. 103-111, 2006.

MUNOZ-PRICE, L.S.; WEINSTEIN, R.A. *Acinetobacter* infection. **N Engl J Med**, v. 358, p. 1271-1281, 2008.

NAAS, T. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 9, p. 4826-4829, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CLSI/NCCLS). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard. 6th. ed. NCCLS document M7-A6. Wayne, PA, USA, 2003.

NORDAMNN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, n. 6, p. 321-331, 2002.

OH, E. J. *et al.* Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. **J Microbiol Methods**, v. 54, p. 411-418, 2003.

OLIVER, A. Resistencia a carbapenemas y *Acinetobacter baumannii*. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 22, n. 5, p. 259-61, 2004.

OUDERKIRK, J. P. *et al.* Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n.8, p. 2659-2662, 2003.

OTEO, J. *et al.* Genotypic diversity of imipenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Spain. **J Infection**, v. 55, p. 260-266, 2007.

PATON, R. *et al.* ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 2, p. 81-88, 1993.

PELEG, A. *et al.* *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecyclina: a cautionary report. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, p. 128-131, 2007.

PEREZ, F. *et al.* Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 10, p. 3471-3484, 2007.

PFALLER, M.A. *et al.* Antimicrobial activity of cefepime tested against ceftazidime-resistant gram-negative clinical strains from North American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1998-2004). **Diag Microbiol Inf Dis**, v. 56, p. 63-68, 2006.

PITOUT, J.D.D. *et al.* Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a large centralized laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 7, p.3129-3135, 2005.

POIREL, L. *et al.* OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 1, p. 202-208, 2005.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, p. 826-836, 2006.

PRASHANTH, K.; BADRINATH, S. Simplified phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* spp. and their antimicrobial susceptibility status. **J Med Microbiol**, v. 49, p. 773-778, 2000.

RASMUSSEN, J. W.; HOIBY, N. Oxa-type carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, p. 373-383, 2006.

SADER, H. S. *et al.* IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clin Microb Infect**, v. 11, p. 73-6, 2005.

SCHAFER, J. *et al.* Early experience with tigecycline for ventilator-associated pneumonia and bacteremia caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Pharmacotherapy**, v. 27, p. 980-987, 2007

SEGAL, H.; ELISHA, B.G. Use of Etest M β L strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, p. 568, 2005

SEIFERT, H. *et al.* Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 9, p. 4328-4335, 2005.

SINGH, A. *et al.* Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

STEPHENS, C. *et al.* Emergence of resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients within an acute care teaching hospital and a long-term acute care hospital. **Am J Infect Control**. V.35, p.212-215, 2007.

TENOVER, F.C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

TJERNBERG, I.; URSING, J. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* strains identified by DNA-DNA hybridization. **APMIS**, v. 98, p. 320-326, 1989.

TOGNIM, M. C. B. *et al.* Resistance trends of *Acinetobacter* spp in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int J Infect Dis**, v. 8, p. 284-291, 2004.

TOGNIM, M. C. B. *et al.* Dissemination of IMP-1 metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infect Control and Hosp Epidemiol**, v. 27, n. 7, p. 742-747, 2006.

TOLEMAN, M. A. *et al.* Molecular characterization of SPM-1 a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, n. 5, p. 673-679, 2002.

TOWNER, K. J. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. **J Med Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 721-746, 1997.

TURTON, J. *et al.* Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 7, p. 3074-3082, 2005.

TURTON, J. *et al.* Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 7, p. 2630-2634, 2006a.

TURTON, J. *et al.* Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 2974-2976, 2006b.

URBAN, C.; SEGAL-MAURER, S.; RAHAL, J. J. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis**, v. 36, n. 5, p. 1268-74, 2003.

VENEZIA, S.N.; LEAVITT, A.; CARMELI, Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n. 4, p. 772-774, 2007.

VILLEGAS, M.V. *et al.* Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 6, p. 2001-2004, 2007.

WALSH, T. R. *et al.* Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 8, p. 2755-2759, 2002.

WALSH, T. R. *et al.* Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.

WALSH, T. R. The emergence and implications of metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Infect**, v. 11(Suppl. 6), p. 2-9, 2005.

WENDT, C. *et al.* Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 6, p. 1394-1397, 1997.

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

WOOD, G. C. *et al.* Tetracyclines for treating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. **Intensive Care Med**, v. 29, p. 2072-2076, 2003.

WOODFORD, N. *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Inter J antimic Agents**, v. 27, p. 351-353, 2006.

YAN, J.J. *et al.* Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. **Diag Microbiol Inf Dis**, v. 49, n. 1, p. 5-11, 2004.

YONG, D. *et al.* Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 10, p. 3798-3801, 2002.

YOON, J. *et al.* In vitro double and triple synergistic activities of Polymyxin B, Imipenem, and Rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 48, n. 3, p. 753-757, 2004.

YORK, M. K.; SCHRECKENBERGER, P. C.; MILLER, J. M. Identification of Gram-negative bacteria. In: H. D. Isenberg (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook**, Second Edition. Washington, DC: ASM Press, v.1,p.3.18.2.1-.21, 2004.

ZARILLI, R. *et al.* Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 946-953, 2004.

ZONG, Z. *et al.* An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase in western China. **Inter J Antimic Agents**, v. 31, p. 50-54, 2008.

ANEXOS

ANEXO 1 - SOLUÇÕES TAMPÕES

4.1 - TAMPÃO TRIS EDTA

Tris.....	1,21 g
Edta.....	3,72 g
Água MILLI-Q esterilizada.....	1.000,00 ml

Preparo:

Pesar os sais e dissolver em 900 ml de água milli-q esterilizada em seguida ajustar o pH em 7,5 com NaOH 10 M e completar o volume para 1.000 ml.

4.2 - TAMPÃO SALINA EDTA

NaCl.....	4,38 g
Edta.....	9,30 g
Água MILLI-Q esterilizada.....	1.000,00 ml

Preparo:

Pesar os sais e dissolver em 900 ml de água milli-q esterilizada em seguida ajustar o pH em 7,5 com NaOH 10 M e completar o volume para 1.000 ml.

4.3 - TRIS BORATO EDTA 10X

Tris.....	108,00 g
Edta.....	7,50 g
Ácido Bórico.....	55,80 g
Água MILLI-Q esterilizada.....	1.000,00 ml

Preparo:

Pesar os sais e dissolver em 800 ml de água milli-q esterilizada em seguida completar o volume para 1.000 ml. Não ajustar o pH.

4.4 - Tampão de Lise para Gram-negativos

NaOH 10M	50,0 ml
SARCOSIL (Sol. Aquosa 30%).....	16,7 ml
EDTA Na ₂	93,0 g
Água MILLI-Q esterilizada.....	500,0 ml

Preparo:

Pesar o sal e dissolver em 300 ml de água milli-q esterilizada acrescentar o sarcosil mais 45 ml de NaOH 10 M e ajustar o pH em 9.5 utilizando se necessario o restante do NaOH 10 M em seguida completar o volume para 500 ml. Utilizar a solução após 24 horas

4.5 - HIDROXÍDO DE SÓDIO 10M

NaOH..... 40,0 g
ÁGUA MILLI-Q ESTERILIZADA.....100,0 ml

Pesar o sal e dissolver em 100 ml de água milli-q esterilizada. Utilizar a solução após 24horas.