

SIMONE DE OLIVEIRA LUIZ

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE AMOSTRAS DE *Acinetobacter baumannii*
ISOLADAS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE CURITIBA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dra. Libera Maria Dalla Costa

CURITIBA

2006

A meus pais e a meu marido
dedico este trabalho
e todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, sobre todas as coisas, que foi fiel ao longo de toda esta jornada.

A meu marido, Rodrigo, que sempre foi compreensivo nos momentos de ausência e companheiro, me incentivando e ajudando a alcançar meus objetivos.

A meus pais, Osmarino e Edite, que sempre me apoiaram a seguir meus estudos.

Aos colegas Larissa Bail Teresawa, Jannaina de Mello Vasco, Mara Cristina Scheffer, Alexandre Rosa e Keite da Silva Nogueira, que me auxiliaram na execução deste trabalho.

A orientadora, Libera Maria Dalla Costa, pela atenção e disposição de me guiar nesta tarefa desafiadora.

Ao Núcleo de Estudos em Bacteriologia Clínica de Curitiba, pelo imprescindível apoio financeiro.

Aos funcionários da Seção de Bacteriologia, em especial a Roberto Ribeiro dos Santos, e da Central de Meios e Soluções do HC-UFPR, por terem colaborado na realização deste trabalho.

Aos professores e a Coordenação do Curso, por contribuírem para o enriquecimento de meu conhecimento.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | VII |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | VIII |
| RESUMO | IX |
| ABSTRACT | X |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 OBJETIVOS | 3 |
| 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL | 3 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 3 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 3.1 O MICRORGANISMO | 4 |
| 3.2 INFECÇÕES NOSOCOMIAIS | 5 |
| 3.2.1 Infecção Respiratória | 6 |
| 3.2.2 Bacteremia | 6 |
| 3.2.3 Outras Infecções | 7 |
| 3.3 PATOGÊNESE | 7 |
| 3.4 EPIDEMIOLOGIA | 9 |
| 3.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS | 12 |
| 3.6 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA | 15 |
| 3.6.1 Genética da resistência | 16 |
| 3.6.2 Carbapenemases | 19 |
| 3.6.2.1 Oxacilinas | 20 |
| 3.6.2.2 Metalo- β -lactamases | 23 |
| 3.6.3 Outros Mecanismos | 26 |
| 3.7 TRATAMENTO | 26 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO | 31 |
| 4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM): MÉTODO DE ÁGAR DILUIÇÃO ... | 32 |
| 4.2.1 Agentes antimicrobianos | 32 |
| 4.2.2 Diluição em Placas de Ágar | 34 |
| 4.2.3 Inóculo para Testes de Diluição | 34 |
| 4.2.4 Padronização do Inóculo | 35 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.2.5 | Diluição em Ágar | 35 |
| 4.2.6 | Determinação dos Pontos Finais nos Testes de Diluição em Ágar | 35 |
| 4.3 | AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM AMOSTRAS DE <i>A. baumannii</i> | 36 |
| 4.3.1 | Detecção Fenotípica de Metallo- β -lactamase | 36 |
| 4.3.2 | Detecção Genotípica de Metallo- β -lactamase e Oxacilinase | 39 |
| 4.3.3 | Restrição Enzimática | 41 |
| 4.3.4 | Seqüenciamento do Produto Amplificado | 41 |
| 4.3.4.1 | Purificação do Produto de PCR | 41 |
| 4.3.4.2 | Seqüenciamento | 42 |
| 4.3.4.3 | Precipitação de DDNTPs não incorporados | 42 |
| 4.3.4.4 | Determinação da Seqüência do DNA | 43 |
| 5 | RESULTADOS | 44 |
| 6 | DISCUSSÃO | 52 |
| 7 | CONCLUSÕES | 58 |
| | REFERÊNCIAS | 59 |
| | APÊNDICE | 67 |
| | ANEXO | 79 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - MODELO ESQUEMÁTICO DO POSICIONAMENTO DOS DISCOS PARA PESQUISA DE M β L PELO TSDD..... | 37 |
| FIGURA 2 - ILUSTRAÇÃO DE RESULTADO POSITIVO PARA O TSDD..... | 38 |
| FIGURA 3 - ILUSTRAÇÃO DE RESULTADO NEGATIVO PARA O TSDD | 38 |
| FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i> MULTIRESISTENTES POR UNIDADE CLÍNICA DO HC-UFPR..... | 45 |
| FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>A. baumannii</i> MULTIRESISTENTES POR SÍTIO ANATÔMICO | 45 |
| FIGURA 6 - COMPARAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM mm (DD) COM A CIM EM μ g/mL (AD) DA POLIMIXINA B | 48 |
| FIGURA 7 - PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>bla</i> _{IMP-1} OBTIDOS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>A. baumannii</i> | 50 |
| FIGURA 8 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>bla</i> _{OXA-23} EM ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>A. baumannii</i> | 51 |
| | |
| GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ENTRE OS MÉTODOS AD E DD PARA POLIMIXINA B..... | 47 |
| | |
| TABELA 1 - IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA <i>Acinetobacter baumannii</i> | 32 |
| TABELA 2 - CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE DO TESTE DE CIM SEGUNDO O CLSI PARA AMOSTRAS DE <i>A.baumannii</i> E CEPAS CONTROLE | 33 |
| TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTOQUE E CONCENTRAÇÕES TESTADAS PARA AMOSTRAS DE <i>A. baumannii</i> .. | 34 |
| TABELA 4 – CIM ₅₀ , CIM ₉₀ E ATIVIDADE DE 12 ANTIMICROBIANOS TESTADOS FRENTE AOS ISOLADOS DE <i>Acinetobacter baumannii</i> MULTIRESISTENTES ISOLADOS NO HC-UFPR | 46 |
| TABELA 5 - RESULTADO DO TESTE DE ACURÁCIA ENTRE OS MÉTODOS DE AD E DD PARA POLIMIXINA B..... | 47 |
| TABELA 6 - PESQUISA FENOTÍPICA DE PRESENÇA DE M β L EM AMOSTRAS DE <i>A. baumannii</i> ISOLADOS NO HC-UFPR..... | 49 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| B.H. I. | - caldo de infusão de cérebro e coração |
| CDC | - Centers for Diseases Control and Prevention |
| CIM | - concentração inibitória mínima |
| CIM ₅₀ | - menor concentração que inibe 50% da população bacteriana |
| CIM ₉₀ | - menor concentração que inibe 90% da população bacteriana |
| CLSI | - Clinical and Laboratory Standards Institute |
| DNA | - ácido desoxirribonucléico |
| dATP | - dinucleotídeo adenosina trifosfato |
| dCTP | - dinucleotídeo citosina trifosfato |
| dGTP | - dinucleotídeo guanosina trifosfato |
| dTTP | - dinucleotídeo timina trifosfato |
| 2-MPA | - ácido 2-mercaptopropiônico |
| EDTA | - ácido etilenodiaminotetracético |
| °C | - graus centígrados |
| <i>gyrA</i> | - gene que codifica para GyrA |
| GyrA | - subunidade A da DNA girase |
| HC-UFPR | - Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná |
| Kb | - kilobases |
| LBA | - lavado bronco-alveolar |
| LEMC | - Laboratório Especial de Microbiologia Clínica |
| mg | - miligrama |
| mL | - mililitro |
| mm | - milímetro |
| n | - número de amostra |
| nm | - nanômetros |
| NaCl | - cloreto de sódio |
| NCCLS | - comitê nacional para padronização de laboratórios |
| <i>parC</i> | - gene que codifica para ParC |
| ParC | - subunidade C da Topoisomerase IV |
| PFGE | - <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (eletroforese em campo pulsado) |
| pH | - potencial hidrogênio-iônico |
| sp | - espécie |
| spp | - espécies |
| TSA | - ágar tríptico de soja |
| UFC | - unidades formadoras de colônias |
| UFPR | - Universidade Federal do Paraná |
| µg | - micrograma |
| µL | - microlitro |
| µg/mL | - microgramas por mililitro |

RESUMO

Acinetobacter baumannii são geralmente comensais, porém nas últimas décadas tem aumentado sua importância como patógeno oportunista, principalmente em ambiente nosocomial. O uso extensivo de terapia antimicrobiana em hospitais tem contribuído para a seleção e para o aumento no número de isolados de *A. baumannii* resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos, inclusive aos carbapenems. Nestes casos a terapia antimicrobiana é problemática, e as opções de tratamento são a combinação ampicilina/sulbactam, e em alguns casos a indicação é a polimixina B. Neste estudo, avaliou-se a suscetibilidade de 229 amostras de *A. baumannii* isoladas no HC-UFPR frente a doze antimicrobianos pelo método de diluição em ágar. Pesquisou-se a presença de oxacilinase por PCR (gene *bla*_{OXA-23}), e a presença de metalo-β-lactamase (MβL) pelo teste de sinergismo de duplo disco (TSDD) e por PCR (genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2}). O único antimicrobiano com boa potência (CIM₅₀=0,5 µg/ml) e atividade (CIM₉₀=1,0µg/ml) foi a polimixina B, para os demais CIM₅₀ e CIM₉₀ foram maior ou igual ao valor do ponto de corte para resistência. O TSDD apresentou resultado positivo para MβL em 41 amostras, das quais uma foi confirmada por PCR como produtora da enzima *IMP-like*, e com os genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2} não houve produto. Nas 40 amostras com PCR negativo para MβL submetidas à PCR para OXA-23 obteve-se produto compatível ao gene *bla*_{OXA-23} (501 pb). As 188 amostras, negativas no TSDD, foram submetidas à técnica de PCR, com o oligonucleotídeo iniciador para OXA-23, 184 tiveram produto compatível com o fragmento amplificado do gene *bla*_{OXA-23}. 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 são compatíveis confirmaram a presença da enzima. Faz-se necessário aprofundar o estudo com estes isolados para confirmar se houve expansão do clone inicial ou trata-se de uma transferência de genes de resistência, além de elucidar a elevada resistência das amostras aos carbapenems cujos mecanismos não foram identificados neste estudo.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*, resistência aos carbapenems, metalo-β-lactamases, oxacilinases

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii are generally commensals, however in the last decades it has increased its importance as opportunistic pathogen, mainly in nosocomial environment. Extensive use of antimicrobial chemotherapy within hospitals has contributed for the selection and the increase in the number of *A. baumannii* strains resistant to a wide range of antibiotics, including the carbapenem. In these cases the antimicrobial therapy is problematic, and the treatment options are the association ampicillin/sulbactam, or in some cases the indication is polymyxin B. In this study, the susceptibility of 229 samples of *A. baumannii* from HC-UFPR was evaluated against twelve antimicrobials by the agar dilution method. The presence of oxacilinase was investigated by PCR (gene *bla*_{OXA-23}), and the presence of metallo-β-lactamase by double-disk synergy test (DDST), and by PCR (genes *bla*_{IMP-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2}). The polymyxin B was the only antimicrobial with good potency (MIC₅₀=0,5 µg/ml) and activity (MIC₉₀=1,0µg/ml). The MIC₅₀ and MIC₉₀ value was bigger or equal to the value of the resistance breakpoint. The DDST presented positive results to MβL enzymes in 41 samples, out of them only one was confirmed positive for *bla*_{IMP-1} gene by PCR and none amplified product was observed with the *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2} specific primers. The remaining 40 samples (MβL negative PCR) were submitted to PCR for OXA-23, and yield a product of 501 bp compatible with *bla*_{OXA-23}. Among the negatives samples to MβL, 188 were submitted to the PCR technique, with OXA-23 primer, 184 had compatible product with the fragment amplified of the gene *bla*_{OXA-23}. The enzymatic restriction with the enzyme *Hind* III that generated fragments of 390 and 110 bp in all OXA-23 PCR products and sequence analysis of one sample had confirmed the presence of the enzyme. It's necessary to perform a molecular typing method in this collection to confirm if it is an expansion of initial clone or it is a polyclonal dissemination, beyond elucidating the high carbapenem resistance of the strains whose mechanisms had not been identified in this study.

key-words: *Acinetobacter baumannii*, carbapenem resistance, metallo-β-lactamases, oxacilinases

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii compreende cocobacilos gram-negativos, aeróbicos, imóveis, catalase positiva e oxidase negativa. São geralmente comensais, mas nas últimas décadas tem aumentado sua importância como patógeno oportunista, principalmente em ambiente nosocomial (BERGOGNE-BÉRÉZIN e TOWNER, 1996).

Baseado na homologia do DNA o gênero *Acinetobacter* compreende vinte e cinco grupos distribuídos em vinte e cinco espécies genômicas (BOUVET e GRIMONT, 1986; BOUVET e JEANJEAN, 1989; TJERNBERG et al., 1989; GERNER-SMIDT e TJERNBERG, 1993; VANEECHOUTTE et al., 1999; NEMEC et al., 2001; NEMEC et al., 2003). Apesar de existirem pequenas diferenças nos esquemas de numeração, propostos por diferentes autores, para as espécies genômicas. Os grupos 1 (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 3 e 13TU, relatado por Tjernberg e Ursing, são extremamente semelhantes, e por isso recebem a denominação de complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii*. *A. baumannii* é a principal espécie associada a surtos de infecção nosocomial, porém as demais espécies deste complexo também podem causar infecções. O diagnóstico de infecção pelas genoespécies incomuns de *Acinetobacter* depende de indicação clínica e isolamentos repetitivos da mesma amostra a partir do mesmo paciente. Pois tais isolados, a partir de amostras clínicas, são freqüentemente considerados como contaminantes derivados do ambiente (BERGOGNE-BÉRÉZIN e TOWNER, 1996).

A identificação bioquímica de *A. baumannii* compreende provas bioquímicas básicas, como a fermentação de glicose, redução de nitrato a nitrito, detecção de hemólise em ágar sangue de carneiro, utilização de citrato e outras fontes de carbono, e principalmente crescimento em caldo de infusão de cérebro e coração a 44°C (BOUVET e GRIMONT, 1986).

Isolados de *Acinetobacter* spp têm características únicas entre as bactérias gram-negativas nosocomiais que favorecem sua persistência no ambiente hospitalar. Eles, geralmente, são resistentes à ação de muitos antimicrobianos, propagam facilmente de um paciente para outro, e são resistentes à dessecação, deste modo

persistem no ambiente por longos períodos, que podem ser de aproximadamente 27 dias. Este fato poderia explicar sua propensão por causarem surtos epidêmicos prolongados (GALES et al., 2001b; ZARRILLI et al., 2004).

As espécies de *Acinetobacter*, especialmente *A. baumannii*, estão envolvidas em um amplo espectro de infecções nosocomiais, incluindo bacteremia, meningite secundária e infecção do trato urinário, mas sua maior prevalência é como agente de pneumonia nosocomial, particularmente pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs), (TOWNER, 1997).

Tempo de internação prolongado em hospital, internamento em UTI, ventilação mecânica e terapia antimicrobiana prévia são os principais fatores de risco para colonização e/ou infecção por *A. baumannii* (CISNEROS e BAÑO, 2002; KOELEMAN et al., 2001).

O uso extensivo de terapia antimicrobiana em hospitais tem contribuído para o aumento no número de linhagens resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos, incluindo β -lactamases de amplo espectro, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (ZARRILLI et al., 2004). A prevalência de isolados de *Acinetobacter* resistentes a carbapenems (imipenem, meropenem) também tem aumentado em hospitais de diferentes regiões geográficas (GALES et al., 2001b). Entretanto no Brasil, segundo relato de TOGNIM et al. (2004), a resistência ao imipenem tem reduzido nos últimos cinco anos, passando de 13,6% em 1997 para 2,2% em 2001 (TOGNIM et al., 2004). Em Curitiba, no final da década de 90, houve o relato dos primeiros casos de *A. baumannii* resistentes a carbapenems (DALLA-COSTA et al., 2003).

A resistência aos antimicrobianos é complexa e dinâmica (LIVERMORE, 2003). *A. baumannii* tem múltiplos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, e principalmente os relacionados aos carbapenems, precisam ser amplamente conhecidos, para que assim, apoiado pelo conhecimento da epidemiologia local das infecções, seja estabelecido o controle deste microrganismo que nos hospitais de Curitiba tem se propagado de modo endêmico. Por essa razão, foi proposto um estudo para avaliar os isolados multiresistentes de *A. baumannii* quanto aos mecanismos de resistência aos carbapenems.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar os mecanismos de resistência a carbapenems em amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas de pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos por meio da concentração inibitória mínima (CIM) dos principais antimicrobianos utilizados na prática clínica.

2. Comparar os métodos de disco difusão e ágar diluição para detecção de resistência a polimixina B.

3. Pesquisar a presença de enzima tipo metalo- β -lactamase por método fenotípico (triagem) e genotípico (confirmatório).

4. Pesquisar a presença da enzima tipo OXA-23 por método genotípico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O MICRORGANISMO

O conceito original do gênero *Acinetobacter* incluía uma coleção heterogênea de cocobacilos gram negativos, imóveis, oxidase positiva e negativa, sapróbios, que podiam ser diferenciados de outras bactérias pela sua ausência de pigmentação. 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.

Bactérias classificadas como membros do gênero *Acinetobacter* sofreram uma longa história de mudanças taxonômicas. E por isso, receberam várias denominações diferentes, entre as mais conhecidas estão *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Moraxella lwoffii*. Entretanto, ainda hoje é objeto de estudo a proposta taxonômica para estes microrganismos, e o delineamento das espécies pertencentes a este gênero.

Atualmente o gênero *Acinetobacter* compreende cocobacilos gram negativos, não-fermentadores, estritamente aeróbicos, imóveis, catalase positiva, e oxidase negativa, apresentando as melhores faixas de crescimento entre 20 e 30°C, sem requerimento de fatores de crescimento, raramente reduzem o nitrato (BERGOGNE-BÉRÉZIN e 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. Porém, em razão de critérios insuficientes para a identificação, costumava-se considerar os membros do gênero como pertencentes a uma única espécie, *Acinetobacter calcoaceticus*.

Usando hibridização de DNA, BOUVET e GRIMONT (1986) delinearão doze genoespécies de *Acinetobacter*, que podiam ser diferenciadas por vinte e oito testes fenotípicos. Quatro novas espécies *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii* e *A. junii*, foram propostas e as espécies *A. calcoaceticus* e *A. lwoffii* foram redescritas (GERNER-SMIDT e TJERNBERG, 1991). A este esquema foram inclusas mais

espécies genômicas. Pois, apesar dos vários estudos de hibridização, sempre aparecem novas variedades não classificadas, o que indica que a variedade do gênero vai além dos grupos já descritos (NEMEC et al., 2001).

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 GERNER-SMIDT et al. (1991) e TJERNBERG (1990), junto com testes de suscetibilidade antimicrobiana, podem ser úteis para laboratórios com recursos limitados e podem ser adaptados para identificar os isolados clínicos, deste modo, evita-se o uso de metodologia molecular, cujo custo é elevado (PRASHANTH e BADRINATH, 2000).

3.2 INFECÇÕES NOSOCOMIAIS

Segundo critérios do CDC infecção nosocomial é uma situação localizada ou sistêmica que resulta de uma reação adversa da presença de agente(s) infeccioso(s) ou sua(s) toxina(s) e que não estava presente nem em incubação na altura da admissão no hospital.

Membros do gênero *Acinetobacter* são sapróbios de vida livre que podem facilmente ser isolados do solo, água e alimentos. Também podem ser encontrados no ambiente clínico, onde podem ser isolados como comensais da pele do corpo clínico e de pacientes. Certos membros do gênero são reconhecidos como patógenos nosocomiais que tem papel relevante na colonização de pacientes admitidos em hospitais (TOWNER, 1997).

Acinetobacter já foi comparado a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), e tem sido denominado “MRSA gram-negativo”. Apesar do comportamento semelhante, seu impacto em termos de morbidade e mortalidade é mais próximo ao dos Estafilococos coagulase negativa. Estima-se que a incidência de bacteremia por *Acinetobacter* seja dez vezes menor do que por *S. aureus* (JOLY-GUILLOU, 2005).

3.2.1 Infecção Respiratória

Antes de 1970 as infecções por *Acinetobacter* eram em sua maioria infecções urinárias pós-cirúrgica, e *Acinetobacter* spp eram isoladas principalmente de pacientes hospitalizados em unidades cirúrgicas ou clínicas. A significativa melhora nas técnicas para manutenção de pacientes graves, durante os últimos 30 anos, tem modificado os tipos de infecções causadas por *Acinetobacter*. Hoje, o papel principal desta bactéria é o de causar pneumonia nosocomial, seguida ao uso de procedimentos de ventilação mecânica. McDONALD et al. (1999) reportaram um aumento na incidência de 0,64% para 6,4% na incidência de pneumonia nosocomial causada por *Acinetobacter* entre 1976 e 1990 (JOLY-GUILLOU, 2005).

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

3.2.2 Bacteremia

Bacteremia nosocomial causada por *A. baumannii* é caracteristicamente uma infecção nosocomial, particularmente em UTIs. É oportunista e atinge quase que exclusivamente pacientes suscetíveis, que tenham sido submetidos a processos invasivos. As manifestações clínicas são inespecíficas. As fontes de infecção mais comuns são cateteres intravascular e no trato respiratório. Muitos dos casos de bacteremia têm origem desconhecida. Alguns destes casos podem ser secundários a infecção por cateter intravascular não diagnosticada ou ter origem intestinal em decorrência da translocação bacteriana (CISNEROS e BAÑO, 2002).

Bacteremia por *Acinetobacter* spp já foi considerada de baixa severidade clínica. Porém, há evidências consideráveis contradizendo este ponto de vista. Ela pode levar a choque séptico, além de poder levar a um curso clínico fulminante, associado à mortalidade precoce de 45% em pacientes com pneumonia comunitária (CISNEROS et al., 1996).

3.2.3 Outras Infecções

Infecções por *Acinetobacter* na pele, feridas, abscessos, endocardites, peritonite e em queimados têm relatos na literatura.

Em infecções de ferida *Acinetobacter* raramente é o único microrganismo isolado. Outras bactérias gram-negativas e anaeróbias são isoladas, sendo assim, geralmente não se utiliza tratamento tão agressivo quanto para outros patógenos isolados de tais infecções, com exceção de imunocomprometidos e queimados, nos quais a infecção pode não ser tão benigna.

O isolamento de *Acinetobacter* em líquido é de diagnóstico complicado, principalmente com presença de glicose baixa, proteína elevada e leucócitos polimorfonucleares. Pois o microrganismo não é um patógeno comum em meningites e normalmente não atravessa a barreira hemato-encefálica em pacientes saudáveis. Geralmente, meningite por *Acinetobacter* é uma infecção esporádica vista em unidades neurocirúrgicas após cirurgia ou trauma craniano, apesar de vários casos epidêmicos terem sido descritos (TOWNER, 1997).

3.3 PATOGÊNESE

Os fatores de risco para infecção ou colonização por *A. baumannii* incluem fatores relacionados ao hospedeiro (severidade da doença, história da infecção), a hospitalização (estadia prolongada em UTI ou em hospital), ao tratamento (administração prévia de cefalosporinas de terceira geração), ou aos procedimentos (entubação, ventilação mecânica, cateter urinário ou neurocirurgia) (VILLERS et al., 1998).

Estes fatores têm promovido 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 locais do corpo, observou-se que uma grande proporção dos pacientes internados em UTI tornou-se secundariamente

colonizados 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 por *A. baumannii*. Sob circunstâncias epidemiológicas especiais, tais como as observadas em UTI, a prevenção inadequada da transmissão transversal determina que o estado de portador ocorra muito cedo durante a admissão na UTI (CORBELLA et al., 2000).

O uso de antimicrobianos é um dos poucos fatores controláveis na UTI, por isso evitar o uso desnecessário deve ser prioridade na manutenção de tais pacientes. O uso de antimicrobianos provavelmente altera a microbiota normal e resulta na seleção de microrganismos resistentes, como *A. baumannii* (BERGOGNE-BÉRÉZIN e TOWNER, 1996).

A. baumannii é responsável por surtos repentinos que causam surpresa e são de difícil controle. As circunstâncias locais das unidades clínicas e seu ambiente determinam o tipo de infecção, e o conseqüente risco de disseminação, levando a ocorrência de surto. Considera-se *Acinetobacter* um patógeno de baixa virulência, que pode permanecer sob ou dentro do corpo sem causar doença. Assim, a disseminação pelas mãos do corpo clínico geralmente não é detectada. Pacientes com sintomas de infecção por *Acinetobacter* são a ponta do *iceberg* da colonização. Quando infecções causadas por *Acinetobacter* tornam-se aparentes, o número de pacientes colonizados é, provavelmente, elevado. Então as precauções para prevenir um surto são tardias. Uma vez que o surto está estabelecido, todas as superfícies inanimadas no ambiente podem ser reservatório de *Acinetobacter* (JOLY-GUILLOU, 2005).

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 deste microrganismo ainda têm que ser 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 composto por sideróforos (CHOI et al., 2005; JOLY-GUILLOU, 2005).

Os lipopolissacarídeos (LPS) estão envolvidos na resistência ao complemento no 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 bactéria patogênica é o principal fator de virulência e sabe-se que protege a bactéria das defesas do hospedeiro. Em estudos experimentais, linhagens de *Acinetobacter* que produzem exopolissacarídeo têm demonstrado serem mais patogênicas do que as não produtoras, especialmente em infecções polimicrobianas com outras espécies de elevada virulência (JOLY-GUILLOU, 2005).

3.4 EPIDEMIOLOGIA

Acinetobacter spp tem sido freqüentemente relatado como sendo o agente causador de surtos hospitalares. As circunstâncias de alguns surtos demonstram a sobrevivência longa do *Acinetobacter* em ambientes secos e inanimados (WENDT et al., 1997). *A. baumannii* sobrevive melhor a dessecação do que outras espécies de *Acinetobacter* tais como *A. johnsonii*, *A. junii* e *A. lwoffii*. Isto pode explicar porque isolados pertencentes a estas outras espécies têm sido, raramente, relatados em surtos hospitalares (JAWAD et al., 1998). As espécies mais comumente isoladas da pele são *A. lwoffii*, *A. johnsonii*, *Acinetobacter* grupo 3 e *A. radioresistens*. *A. baumannii*, a espécie de maior importância nosocomial é raramente encontrada na pele (SEIFERT et al., 1997). Porém, em surtos *A. baumannii* é isolado de amostras da pele e retal com maior freqüência.

Há relatos de isolados endêmicos individuais de *A. baumannii* persistindo em hospitais por mais de três anos. Não se sabe porque alguns isolados têm propensão de causar surtos hospitalares enquanto outros são isolados esporadicamente de pacientes colonizados ou infectados. Resistência a condições ambientais adversas tais como dessecação é uma propriedade que pode aumentar a transmissibilidade e pode ser característica das amostras de surtos, o que as distingue das não relacionadas a surtos (JAWAD et al., 1998). Mas esta característica sozinha não é suficiente para tornar um isolado epidêmico (WENDT et al., 1997). JAWAD et al. (1998) compararam o tempo de sobrevivência de amostras de *A. baumannii* isoladas de surtos hospitalares ao de isoladas esporadicamente na mesma região. Não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos estudados, o que sugere que todos os isolados podem, quando as condições do ambiente e as oportunidades permitirem, causar infecções múltiplas. Estas condições incluem higiene pobre, medidas de desinfecção impróprias, e provavelmente a elevada proporção de pressão seletiva associada com o uso extensivo de antimicrobianos de amplo espectro (JAWAD et al., 1998).

Em seu estudo WENDT et al. (1997) compararam a habilidade de sobrevivência de isolados epidêmicos e esporádicos de *A. baumannii*, considerando-se a possibilidade de diferença no tempo de sobrevivência dependendo do material da superfície. O material da superfície só influenciou a proporção de microrganismos recuperados e a redução da dessecação. A adesão do microrganismo ao material pode ser responsável pelas diferenças na proporção de recuperação. A influência do material na redução da dessecação pode ser em virtude das substâncias que dissolvem a solução bacteriana e que são tóxicas para os microrganismos. O período de sobrevivência dos microrganismos investigados sob condições secas não foi influenciado pelo material (WENDT et al., 1997).

Comparado a outros gêneros de bacilos gram negativos, *Acinetobacter* sobrevive muito melhor na ponta dos dedos ou sob superfícies secas quando testado sob condições que simulam o ambiente hospitalar. Sabe-se que a pele dos pacientes e do corpo clínico estão envolvidas na transmissão dos isolados, e em alguns surtos, a tipagem molecular tem identificado isolados epidêmicos na pele dos pacientes (JAWAD et al., 1998).

A incidência de pacientes colonizados ou infectados em UTI passou de 6,3 casos / 100 admissões em 1992 para 14 casos / 100 admissões em 1996. Sendo assim, as infecções por *A. baumannii* são a causa mais comum de infecção em pacientes de UTI. Os pacientes colonizados e a contaminação do ambiente podem agir como os maiores reservatórios epidemiológicos de infecção (CORBELLA et al., 2000).

Os pacientes exercem um importante papel epidemiológico em grandes surtos, pois a elevada taxa de portadores fecais em UTI está fortemente associada ao trato digestivo como reservatório de infecções por *A. baumannii* assim como em outros surtos de infecções por bacilos gram negativos. Apesar desta bactéria não ser considerada habitante do trato digestivo de humanos sadios, em pacientes hospitalizados com doenças graves, a microbiota normal do intestino pode ser modificada (CORBELLA et al., 1996). A taxa de portadores fecais comunitários é de 0,8% enquanto em pacientes hospitalizados é de 41% (DIJKSHOORN et al., 2005). Outro caminho que pode levar ao desenvolvimento de pneumonia nosocomial ou pneumonia envolve o crescimento bacteriano em excesso no estômago. Este processo pode ocorrer sob condições de secreção ácida reduzida no estômago, o que ocorre em muitos pacientes de UTI. *Acinetobacter* tem crescido sob tais condições (JOLY-GUILLOU, 2005). Apesar da descontaminação intestinal seletiva poder ser considerada uma medida de controle adicional, em virtude das elevadas taxas de portadores intestinais observadas em surtos por *A. baumannii*, não se recomenda seu uso por várias razões. Estas razões são a possível rota exógena da origem de tais infecções, tanto de objetos inanimados como de outros locais do corpo concomitantemente contaminados tais como a pele, e as poucas opções de terapia antimicrobiana para a população de pacientes infectada por *A. baumannii*. A resistência antimicrobiana múltipla leva a dúvidas sobre a real eficácia da descontaminação digestiva, pois muitos isolados são resistentes aos aminoglicosídeos, que são os antimicrobianos de escolha junto com polimixinas (CORBELLA et al., 2000). Além disso, a pesquisa de colonização gastrintestinal e de pele tem a finalidade de, apenas, monitorar alterações no perfil de resistência (DY et al., 1999). Porém, AGUSTÌ et al. (2002) concluíram em seu estudo que a descontaminação seletiva do trato digestivo é uma ferramenta benéfica para ajudar

no controle de surtos causados por *A. baumannii*, pois assim haverá redução no reservatório intestinal de pacientes colonizados (AGUSTÍ et al., 2002).

Muitos estudos têm isolado *A. baumannii* do ambiente hospitalar, das mãos e de *swabs* nasais do corpo clínico. A transmissão tanto pelo ambiente quanto pelo corpo clínico é importante para a manutenção dos surtos (AYAN et al., 2003). A ocorrência freqüente de *A. johnsonii*, *A. Iwoffii* e genoespécie 12 nas mãos dos funcionários dos hospitais e de outros trabalhadores sugere que a pele humana seja um habitat natural destas espécies. É digno de nota que na pesquisa de *Acinetobacter* spp em enfermeiras são encontradas outras espécies além de *A. baumannii*, ao passo que pacientes na mesma unidade são infectados por *A. baumannii* e não com a espécie encontrada na mão da enfermagem. Conclusões epidemiológicas incorretas podem ser extraídas a respeito dos isolados de enfermeiras e pacientes caso não haja identificação ao nível de espécie (BOUVET e GRIMONT, 1987).

Equipamentos médicos que são reutilizados contaminados, tais como ventiladores, respiradores, e monitores de pressão arterial, na manutenção de pacientes severamente doentes também têm sido implicados na transmissão aos pacientes. Há ainda uma ampla variedade de objetos de uso do paciente tais como cama, travesseiro, aparelho de televisão e de som, que têm sido encontrados contaminados com *Acinetobacter* podendo servir como reservatórios durante um surto nosocomial (JAWAD et al., 1998).

3.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

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

contribuem para o acúmulo da resistência: primeiro, espécies com resistência intrínseca são favorecidas; segundo, mutantes resistentes de linhagens previamente sensíveis são selecionados; terceiro, genes de resistência transferíveis disseminam entre os isolados bacterianos, carregados por plasmídios, transposons e integrons; e, por último, algumas linhagens resistentes propagam-se de modo epidêmico entre pacientes, hospitais e países. A importância relativa destes processos varia com o patógeno e com o local (LIVERMORE e DUDLEY, 2000).

Em um aspecto, a epidemiologia da resistência é extremamente local. A maioria dos surtos envolve poucos pacientes de uma unidade, e a prevalência da resistência é freqüentemente mais elevada nas unidades onde os pacientes mais suscetíveis estão internados e conseqüentemente o uso de antimicrobianos é maior. Em outro, é nacional, o perfil de resistência varia de um continente para outro e de um país para outro. Na América do Norte, as taxas de resistência nos Estados Unidos são superiores as do Canadá. Algumas das piores taxas de resistência estão em países do Leste da Ásia e América do Sul. Finalmente, pode ser internacional, pois alguns determinantes transferíveis de resistência são prevalentes no mundo todo. Algumas linhagens resistentes espalham-se entre países e continentes. Por exemplo, muitas das poucas *E. coli* e *Klebsiella* spp com β -lactamase Amp C mediada por plasmídio no Reino Unido têm ligação epidemiológica ao subcontinente Indiano, onde há evidência de freqüência local em Punjab.

Resistência é uma causa significativa de excesso de morbidade, mortalidade, e custo. Numerosos relatos têm enfatizado a necessidade de uso de antimicrobianos em menor quantidade e de melhor maneira, melhora no controle de infecções, e o desenvolvimento de novos agentes. Entretanto, a redução no uso de antimicrobianos nem sempre leva a redução da resistência, talvez porque as bactérias estejam bem adaptadas ao carregamento de resistência. É simples antecipar o alcance do controle da resistência, e os esforços devem ser de manutenção ao invés de eliminação, com o objetivo de diminuir o desenvolvimento de novas resistências enquanto continua-se a desenvolver novos agentes numa velocidade suficiente para manter-se à frente da bactéria (LIVERMORE, 2003).

A sensibilidade de *A. baumannii* aos antimicrobianos é consideravelmente diferente entre os países, centros e até mesmo entre as unidades de um hospital.

Estas diferenças podem refletir diferentes modelos de uso de antimicrobianos e diferentes situações epidemiológicas. As diferenças no perfil de resistência dos isolados enfatizam a importância da vigilância local para determinar a terapia mais adequada para infecções por *A. baumannii* (CISNEROS e BAÑO, 2002).

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*. Uma elevada proporção de isolados tornou-se resistente a antimicrobianos antigos; de fato, muitos *Acinetobacter* são resistentes aos níveis clínicos da maioria dos antimicrobianos utilizados, incluindo aminopenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas de pequeno espectro e amplo espectro, cefamicinas, a maioria dos aminoglicosídeos, cloranfenicol, e tetraciclina. Para alguns antimicrobianos relativamente novos, tais como cefalosporinas de amplo espectro (quarta geração), imipenem, tobramicina, amicacina e fluoroquinolonas, permanecem relativamente sensíveis, mas a CIM destes antimicrobianos tem aumentado substancialmente na última década. Imipenem já foi a droga mais ativa; de fato, até recentemente, imipenem era ativo contra 100% dos isolados. Infelizmente, as últimas análises dos surtos hospitalares têm documentado a disseminação de isolados resistentes a imipenem (BERGOGNE-BÉRÉZIN e TOWNER, 1996).

O uso extensivo de antimicrobianos no ambiente hospitalar tem levado ao rápido aparecimento de isolados de *A. baumannii* multiresistentes. Em Israel foi mostrado que apenas 50% dos isolados de *A. baumannii* são sensíveis ao imipenem, que cerca de 10% são multiresistentes, e que a suscetibilidade do *A. baumannii* ao imipenem tem declinado de 98% em 1990 para 64% em 2000. A seleção de *A. baumannii* multiresistente é um dos grandes desafios terapêuticos no tratamento de infecções por gram-negativos (SMOLYAKOV et al., 2003).

Dados do estudo SENTRY relatam que no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2001 o Brasil contribuiu com o maior número de isolados de *Acinetobacter* spp (n = 400) da América Latina. A resistência ao imipenem foi de

8,5%. A polimixina B, avaliada contra os patógenos coletados em 2001, apresentou excelente atividade na América Latina, suscetibilidade de 96,4%. Seis isolados, provenientes de três hospitais brasileiros diferentes, foram categorizados como resistentes e apenas um deles também era resistente aos carbapenems (TOGNIM et al., 2004).

3.6 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Em decorrência de sua natureza sapróbia, *Acinetobacter* é um gênero que esteve exposto por longos períodos a organismos produtores de antimicrobianos no ambiente do solo e por pressão seletiva, e talvez como uma consequência tem propensão para desenvolver resistência aos antimicrobianos extremamente rápido. 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 e TOWNER, 1996). A resistência pode resultar da modificação do alvo do antimicrobiano ou do desvio de função daquele alvo, ou pode ser causado por impermeabilidade, efluxo, ou inativação enzimática. Todos os membros de uma espécie podem ser resistentes. Alternativamente, a resistência pode aparecer por seleção de espécies, mutação ou transferência de DNA. A seleção de espécies altera a importância relativa dos diferentes patógenos; mutação e transferência de DNA conferem resistência a espécies previamente sensíveis (LIVERMORE, 2000, 2003).

Os mecanismos básicos de resistência aos carbapenems em *A. baumannii* ainda são pouco entendidos, acredita-se que sejam similares aos já descritos em outras bactérias gram negativas, tais como a produção de β -lactamase capaz de hidrolisar carbapenem (carbapenemases), redução da permeabilidade da membrana externa causada pela perda ou expressão reduzida de porinas, superexpressão de bombas de efluxo para inúmeras drogas e alteração nas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), (FERNÁNDEZ-CUENCA et al., 2003).

Entre os mecanismos de resistência aos carbapenems descritos estão representados os três grandes grupos de mecanismos de resistência aos

antimicrobianos. Em primeiro lugar, a diminuição da concentração do antimicrobiano em seu local de ação, seja por redução da entrada do mesmo, ou seja por sua eliminação através de bombas de efluxo ativas. Este é o mecanismo de resistência mais freqüente em *P. aeruginosa*. Em outras bactérias gram-negativas a contribuição destes mecanismos de resistência é aparentemente menor, mas podem adquirir grande importância quando combinados com outros mecanismos. No caso de *A. baumannii* são descritas alterações dos perfis de proteínas de membrana externa em linhagens resistentes aos carbapenems, mas não há evidências do papel da perda de porinas na resistência a estes antimicrobianos; do mesmo modo, não se conhece a relevância das bombas de efluxo ativa nesta resistência. Em segundo lugar, a resistência aos carbapenems pode ser pela modificação do alvo de atuação. Apesar da resistência aos carbapenems 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*. Por último, a resistência aos carbapenems pode ser por causa da modificação enzimática do antimicrobiano. Sem dúvida, a produção de beta-lactamases constitui o mecanismo, por excelência, dos antimicrobianos beta-lactâmicos (OLIVER, 2004).

3.6.1 Genética da resistência

A alteração da importância de diferentes patógenos oportunistas recebe menor atenção do que a seleção de novos fenótipos de resistência, talvez porque eles não provocam o mesmo efeito causado pelo *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária a vancomicina ou *Acinetobacter* resistente a carbapenem. Contudo, o uso de antimicrobianos favorece espécies ou gêneros que são resistentes, e este processo mina gradualmente antimicrobianos valiosos. Tais mudanças podem ocorrer em pacientes comunitários, mas são um problema maior em pacientes de UTI, cuja defesa frágil os deixa vulneráveis a sucessivas infecções oportunistas (LIVERMORE, 2000). O uso de antimicrobianos rompe a ecologia microbiana do paciente, unidade, população. Qualquer espécie pode ser selecionada. Entre os patógenos gram-negativos, *Acinetobacter baumannii* tem

aumentado sua prevalência em UTIs, e tem adquirido resistência a maioria dos antimicrobianos (LIVERMORE, 2003).

Quando o DNA é replicado, substituições de base incorretas ocorrem ao acaso, numa frequência de 10^{-9} a 10^{-10} por gene. Além disso, erros na cópia podem levar a deleção parcial ou completa de genes. Como resultado, os alvos dos antimicrobianos podem ser alterados, sistemas de efluxo e de inativação da droga podem ser ajustados para cima ou para baixo, e rotas especializadas (porinas e transportadores ativos) podem ser perdidas ou ativadas. Genes de resistência ou seus repressores também podem ser ativados ou inativados pela migração de seqüências de inserção (LIVERMORE, 2003).

Antimicrobianos não causam mutações. Mais propriamente, eles selecionam mutantes resistentes pré-existentes em uma população suscetível (LIVERMORE, 2000). Esta observação concorda com os preceitos de evolução de Darwin, mas uma alteração ocorre através da observação de que a bactéria pode se tornar hipermutante através da inativação do sistema de reparo que normalmente corrige erros de cópia de DNA. Hipermutantes têm taxas de mutação mais elevadas do que células normais e então são mais aptas a tornarem-se resistentes ao primeiro antimicrobiano por mutação. Uma vez selecionados por esta primeira droga, eles podem desenvolver resistência a outros agentes. Neste sentido, os antimicrobianos podem causar a emergência de variantes com propensão aumentada a desenvolver resistência futura (LIVERMORE, 2003).

A maioria das mutações afeta apenas uma classe de antimicrobianos, mas as que afetam a impermeabilidade ou o efluxo podem ter efeito em várias classes. O potencial da perda de porina afeta várias classes de antimicrobianos de modo evidente pela restrição inespecífica da permeabilidade, enquanto o papel do efluxo na resistência de amplo espectro pode se apresentar de maneira inesperada (LIVERMORE, 2003).

A transferência de DNA entre bactérias é crítica para a disseminação da resistência, geralmente ocorre por meio de plasmídios. Eles existem desde muito tempo antes do uso de antimicrobianos mas não carregavam determinantes de resistência, ou raramente o faziam. Desde o advento da era do antimicrobiano, plasmídios tem provado ser o veículo ideal para o recrutamento e a disseminação de

genes de resistência. Junto dos plasmídios, genes de resistência são freqüentemente carregados por transposons, os quais podem lançar determinantes entre plasmídios mais ou menos promíscuos, além de para dentro ou para fora do cromossomo. Outra opção são os bacteriófagos lisogênicos, vírus que infectam bactérias (LIVERMORE, 2003).

Integrans são sistemas naturais de recombinação que facilitam a aquisição e expressão de determinantes de resistência atrás de um promotor. Eles são amplamente distribuídos entre as bactérias gram-negativas, muitas vezes ocorrem dentro de plasmídios e transposons. Genes que podem ser localizados em transposons incluem β -lactamases dos tipos OXA, PSE, VIM e IMP, e muitas enzimas que modificam aminoglicosídeos. Todavia, sabe-se que os genes de β -lactamase de maior sucesso (por exemplo, derivados do gene *bla*_{TEM}) são carregados diretamente por transposons, não dentro de integrans (LIVERMORE, 2003).

A formação do mosaico gênico e a transferência de genes de resistência mediada por bacteriófago parecem ser eventos genéticos raros, e sua importância deve-se ao fato de que linhagens que inicialmente adquirem estes mecanismos podem se espalhar entre os pacientes. Plasmídios, em contraste, geralmente são transmitidos livremente, como ocorre com alguns transposons inseridos em cromossomos. A disseminação desses elementos pode gerar genes epidêmicos, com os mesmos determinantes estabelecidos em diversos organismos (LIVERMORE, 2000).

A disseminação de plasmídios, transposons, e integrans entre bactérias e espécies promovem a tão falada epidemia gênica. Muitos plasmídios e transposons carregam múltiplos genes de resistência, o que confere resistência a diferentes antimicrobianos, e a seleção de qualquer determinante pode conservar o plasmídio inteiro e sua resistência (LIVERMORE, 2003).

A extensão dos plasmídios epidêmicos depende da transmissibilidade de plasmídios individuais ou transposons conjugativos, e da habilidade do transposom armazenar genes para transferir entre os plasmídios, alguns dos quais tem espectro de hospedeiros mais amplo do que outros. Um fator chave é a localização de alguns genes de resistência em integrans, os quais podem ser localizados dentro de transposons. Muitos plasmídios epidêmicos carregam múltiplas resistências e

permanecem sob evolução ativa, com determinantes sendo ganhos, alterados e perdidos. A amplificação dos genes de resistência pode ocorrer dentro de plasmídios, aumentando a expressão do produto e o nível de resistência (LIVERMORE, 2000).

Entre os principais modos de transferência gênica cromossomal, apenas a conjugação tem sido demonstrada como importante na transferência de genes de resistência a antimicrobianos entre as diferentes espécies de *Acinetobacter*. Vários estudos relatam que mais de 80% dos isolados de *Acinetobacter* carregam múltiplos plasmídios de tamanho molecular variado (BERGOGNE-BÉRÉZIN e TOWNER, 1996).

3.6.2 Carbapenemases

Uma ampla variedade de antimicrobianos β -lactâmicos são usados no tratamento de doenças infecciosas. Estes antimicrobianos bloqueiam a biossíntese da parede celular da bactéria pela inibição de uma transpeptidase. Porém, a bactéria tem desenvolvido inúmeras estratégias para resistir aos antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo a produção de uma família de enzimas, β -lactamases. As β -lactamases catalisam a hidrólise dos antimicrobianos β -lactâmicos, abrindo o anel β -lactâmico e tornando o antimicrobiano inativo.

β -lactamases têm sido agrupadas em quatro classes moleculares, A, B, C e D, baseadas na homologia da seqüência dos aminoácidos por Ambler et al., 1980. Aquelas que pertencem as classes A, C e D são serina β -lactamases que possuem serina no sítio ativo, e aquelas que pertencem a classe B são metalo- β -lactamases que contém um ou dois íons zinco no sítio ativo (JIN et al., 2004).

Carbapenemases são um grupo fenotípico de enzimas, uma mistura heterogênea de β -lactamases pertencentes a classe molecular de Ambler A (penicilinas), classe B (metaloenzimas) e classe D (oxacilinas). Estas enzimas têm a propriedade comum de hidrolisar, ao menos parcialmente, imipenem ou meropenem, além de hidrolisar outras penicilinas e cefalosporinas.

As carbapenemases da classe A são raras, sendo 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 plasmídios (KPC-1, GES-2) em *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

As enzimas da classe B são as carbapenemases mais significativas clinicamente. São metaloenzimas das sub-classes IMP ou VIM. Há relatos do mundo todo mas a maioria é do Sudeste da Ásia e Europa. As metaloenzimas, cujos genes são localizados em plasmídios e integrons, hidrolisam todos os β -lactâmicos, exceto aztreonam (NORDMANN e POIREL, 2002) e requerem zinco (Zn^{++}) para sua atividade, e por isso, são inibidas por compostos quelantes de cátions divalente como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (OLIVER, 2004).

Os relatos de carbapenemases da classe D têm aumentado em *A. baumannii*. O perfil de hidrólise destas oxacilinasas (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 oxacilinasas, com exceção da OXA-23, que é resistente ao ácido clavulânico (NORDMANN e POIREL, 2002).

3.6.2.1 Oxacilinasas

Oxacilinasas são enzimas pertencentes à classe molecular D e estão inclusas no grupo 2d da classificação de BUSH et al., 1995. Vinte e três oxacilinasas foram descritas por enquanto, e muitas delas são derivadas da OXA-2, OXA-3 e OXA-10 e são produzidas principalmente por *P. aeruginosa*. A árvore filogenética das β -lactamases tipo OXA apresenta pelo menos cinco grupos com base na seqüência de aminoácidos (BOU et al., 2000b).

O primeiro isolado de *A. baumannii* com serina β -lactamase capaz de hidrolisar carbapenem, foi coletado em 1985 na Escócia, e esta enzima foi denominada inicialmente de ARI-1 (AFZAL-SHAH et al., 2001). ARI-1 β -lactamase é mediada por plasmídios, 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 relatadas tem uma extensa

especificidade de substratos (PATON et al., 1993). O gene *bla*_{ARI-1} é composto por 882 pb, com o códon inicial ATG e o final TAA, que traduz uma proteína de 273 aminoácidos, o que demonstra uma seqüência homóloga à das enzimas da classe D (grupo 2d). Algumas características únicas e propriedades bioquímicas distintas foram observadas. Duas regiões altamente conservadas, S-T-F-K (serina-treonina-fenilalanina-lisina) e K-T-G (posições 79 a 82 e 216 a 218), foram identificadas, acredita-se que contribuam para o funcionamento do sítio ativo de serina. Uma terceira região, F-G-N 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). Esta única substituição pode ter significantes efeitos bioquímicos e é possivelmente um fator na evolução da resistência a carbapenem nesta enzima. Assim, ARI-1 é uma β -lactamase de classe D e recebeu uma denominação alternativa OXA-23 (DONALD et al., 2000).

A oxacilinase, OXA-24, é mediada por cromossomos, tem atividade hidrolítica moderada contra carbapenems e tem elementos estruturais característicos de β -lactamases de classe D. A seqüência de aminoácidos contém regiões encontradas em serina β -lactamases: o sítio ativo da enzima contém a tétrade STFK. Entretanto, as regiões típicas YGN (tirosina-glicina-asparagina) e KTG (lisina-treonina-arginina), que são características de outras β -lactamases de classe D, são substituídas na enzima OXA-24 por FGN e KSG, respectivamente. Apesar da relevância destas substituições para as propriedades enzimáticas da proteína ainda não terem sido elucidadas, é importante salientar que a OXA-23 também contém a tríade FGN, e esta β -lactamase também tem atividade hidrolítica moderada contra carbapenems e aumenta a resistência aos carbapenems em *A. baumannii* (BOU et al., 2000b).

A OXA-25 foi descoberta a partir de um isolado da Espanha, a OXA-26 da Bélgica e a OXA-27 de Singapura. Estas enzimas seqüenciadas, somadas as OXA-23 e OXA-24, formam dois grupos. O primeiro compreende as enzimas OXA-23 e OXA-27, com 99% de homologia entre os aminoácidos; o segundo inclui as OXA-24, OXA-25, e OXA-26, que tem 98% de homologia. A homologia entre os dois grupos é de apenas 60%, mas eles são mais relacionados entre si do que com qualquer outra β -lactamase tipo OXA, nenhum deles tem atividade hidrolítica significativa contra

carbapenem. Todas possuem a téttrade 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 (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. Assim, possui a téttrade STFK, os sítios KSG e FGN. O perfil de atividade hidrolítica é restrito, inclui principalmente as penicilinas. A hidrólise do imipenem é de baixo nível, e a do meropenem não foi detectada (HÉRITIER et al., 2003).

OXA-51 foi descoberta em isolados clínicos multiresistentes 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 esta substituição nestas carbapenemases confere atividade hidrolítica contra os carbapenems (BROWN et al., 2005).

Uma amostra de *A. baumannii* resistente a carbapenem foi isolada em Toulouse, França em 2003. A partir de experimentos bioquímicos e de clonagem, uma nova oxacilinase mediada por plasmídio, OXA-58, foi descoberta. O perfil de hidrólise é semelhante ao das demais oxacilinas. A téttrade STFK e o sítio KSG foram encontrados, porém possui o clássico sítio YGN das oxacilinas ao invés do sítio FGN encontrado em todas as oxacilinas identificadas em *A. baumannii*. Isto confirma que não é a presença da fenilalanina que garante a atividade hidrolítica. OXA-58 tem pouca semelhança com os dois grupos homólogos, compartilhando

48% de identidade dos aminoácidos com OXA-23 e 47% com OXA-24, que são representativos dos dois grupos (POIREL et al., 2005).

3.6.2.2 Metallo- β -lactamases

Todas as metallo- β -lactamases (M β Ls) hidrolisam imipenem, mas esta habilidade varia consideravelmente e a taxa de hidrólise pode ou não ser correlacionada com o nível de resistência bacteriana aos carbapenems. Estas enzimas possuem como característica marcante serem inibidas por EDTA bem como por outros agentes quelantes de cátions divalentes, sendo assim correlacionada com seu mecanismo de ação.

Acredita-se que a disseminação dos genes de M β L seja dirigida pelo consumo regional de cefalosporinas de amplo espectro ou carbapenems. A maioria, se não todos, os genes que codificam enzimas tipo IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase) e GIM (*German* imipenemase) são encontradas como cassetes nos integrons de classe 1. Os genes da M β L tipo IMP também podem ser encontrados em integrons de classe 3. Cassetes gênicos são pequenos pedaços circulares de DNA, de tamanho aproximado de 1 kb, que compreendem um gene junto com um local de recombinação, que se designa como um elemento de 59 pb. Integrons são constituídos por três regiões; a região conservada -5' (5'CS), a região conservada -3' (3'CS) e uma região variável (WALSH, 2005a). Um integron pode transportar genes de resistência a um ou mais classes de antimicrobianos e então, tanto uma quanto a outra classe de antimicrobiano pode ser selecionada como elemento de resistência. Mas, a plasticidade genética é provida de aumento quando a mobilidade dos integrons é facilitada por outros elementos genéticos tais como plasmídios e transposons (WALSH, 2005b).

M β Ls, assim com as serina β -lactamases, conferem resistência aos β -lactâmicos pela clivagem do anel β -lactâmico; porém a maneira pela qual os dois grupos de enzimas alcançam esta clivagem é diferente. M β Ls 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 LS 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. É interessante salientar, que nenhuma das M β LS hidrolisam aztreonam de modo eficiente, e ele tem sido lembrado como um inibidor terapêutico de M β L (WALSH, 2005a).

Os produtores de M β LS, mais significativos clinicamente, são aqueles nos quais o gene que codifica a enzima é transferível, incluindo *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Deste modo, estas β -lactamases de amplo espectro são identificadas principalmente em espécies bacterianas que já têm um elevado grau de resistência natural a muitas classes de antimicrobianos, assim como em *Acinetobacter* spp. A respeito da resistência aos β -lactâmicos, estas espécies expressam cefalosporinases, têm bombas de efluxo eficientes, e têm pequena permeabilidade de membrana externa intrínseca a muitas moléculas hidrofílicas. Portanto, a multiresistência pode ser facilmente observada como resultado de mecanismos de resistência combinados. O problema com as M β LS é seu perfil de resistência de amplo espectro. Além de, em muitos casos, os genes que codificam M β LS ocorrerem em plasmídios associados a genes que codificam determinantes de resistência a outros antimicrobianos, por exemplo, genes de resistência aos aminoglicosídeos (WALSH, 2005a).

A primeira M β L móvel a ser caracterizada excluindo-se *Bacteroides* spp foi IMP-1, com a descoberta de *P. aeruginosa* cepa GN17203 no Japão em 1988. O Japão tem se tornado o principal reservatório de M β LS tipo IMP, entre as quais estão IMP-1, IMP-2, IMP-3, IMP-6, IMP-10 e IMP-11, espalhadas em um grande número de isolados de *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp e enterobactérias. A crença de que os genes de M β L tipo IMP eram um problema único do Japão foi dissipada com o advento de IMP-2 em 1997 e IMP-5 em 1998, na Itália e Portugal, respectivamente (WALSH, 2005b). As informações na literatura científica sobre M β LS tipo IMP nas

Américas vêm principalmente do Brasil, onde há um sério problema com isolados de *Acinetobacter* spp multiresistente (WALSH, 2005a). O primeiro relato de M β L semelhante ao tipo IMP em *A. baumannii* é do Brasil. A cepa A3227 foi isolada de uma paciente internada no Hospital São Paulo. Era resistente a imipenem, meropenem e cefalosporinas de amplo espectro, porém suscetível a aztreonam, gentamicina e ciprofloxacina, e resistência intermediária a ampicilina/sulbactam e ampicacina (GALES et al., 2003).

É provável que a M β L Européia seja do tipo VIM e não IMP. Sua expansão global, provavelmente da Europa, é rápida e preocupante. As M β Ls tipo VIM são o segundo grupo dominante, e há atualmente treze variantes conhecidas. VIM-1 (Verona imipenase) foi descoberta na Itália, no ano de 1997, em um isolado clínico de *P. aeruginosa*.

O terceiro tipo de M β L adquirida em bacilos gram-negativos é SPM-1 (São Paulo metalo- β -lactamase). Como é típico em outros organismos produtores de M β L, o isolado era resistente a todos os antimicrobianos utilizados para gram-negativos, com exceção a colistina. Relatos não confirmados do Brasil indicam que aproximadamente 20-45% dos isolados de *P. aeruginosa* possuam SPM-1 (WALSH, 2005b).

GIM-1 apareceu como uma M β L única, localizada em uma estrutura distinta de integron, e representa a quarta sub-classe de M β L a ser caracterizada. As amostras clínicas de *P. aeruginosa* que produzem GIM-1 foram isoladas na Alemanha e foram detectadas pelo programa SENTRY de 2002. A análise cinética revela que GIM-1 não tem preferência clara por nenhum substrato (CASTANHEIRA, 2004).

O gene, *bla*_{SIM-1} (*Seoul* imipenemase), foi detectado em sete isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes da Coreia. SIM-1 é codificado por um integron de classe 1, e é mais relacionado as enzimas do tipo IMP do que a qualquer outra M β L (LEE, 2005).

3.6.3 Outros Mecanismos

Apesar do desenvolvimento de novos agentes β -lactâmicos e fluoroquinolonas, aminoglicosídeos ainda são utilizados no tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. Aminoglicosídeos são antimicrobianos bactericidas que podem exibir sinergia quando combinados com β -lactâmicos. Um aumento no número de isolados resistentes tem sido relatado desde 1970. Bactérias podem se tornar resistentes aos aminoglicosídeos por três mecanismos distintos: alteração do alvo ribossômico; redução da entrada do antimicrobiano; e modificação enzimática do antimicrobiano. O terceiro mecanismo é o mais comum em *Acinetobacter*.

Até 1988, as fluoroquinolonas mostraram boa atividade frente a isolados de *Acinetobacter*. Contudo, já existem relatos de elevada resistência. Os mecanismos de resistência as fluoroquinolonas podem ser por alteração na estrutura das subunidades da DNA girase, geralmente por mutação em *gyrA* e/ou *parC*; por redução da permeabilidade da membrana externa ou por aumento do efluxo da célula. Uma substituição em um códon no gene *gyrA* é associada a resistência moderada as quinolonas, enquanto duas substituições nos genes *gyrA* e *parC* conferem resistência elevada. GyrA age como alvo primário e ParC como secundário para as quinolonas no organismo (BERGOGNE-BÉRÉZIN e TOWNER, 1996; TOWNER, 1997).

3.7 TRATAMENTO

Apesar de muitos isolados de *A. baumannii* serem suscetíveis a uma ampla variedade de antimicrobianos, os que causam surtos nosocomiais de infecção são, geralmente, sensíveis a ceftazidima, cefepime, sulbactam, imipenem, meropenem, amicacina, polimixina B e colistina. Porém, o uso aumentado de cefalosporinas e carbapenems tem selecionado a hiperprodução de enzimas tipo Amp-C e mutação de porina nos Estados Unidos, e OXA e metalo- β -lactamases em outras áreas do mundo, deste modo houve redução da eficácia dos β -lactâmicos (URBAN et al., 2003).

Os carbapenems, representados na prática clínica pelo imipenem e meropenem, são os antimicrobianos beta-lactâmicos de mais amplo espectro, e apresentam uma boa atividade frente a muitas bactérias gram-positivas e a maioria das gram-negativas. Entre as características responsáveis por seu amplo espectro estão o baixo peso molecular e sua estrutura zwitteriônica 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 carbapenems é o tratamento das infecções nosocomiais por bactérias gram-negativas multiresistentes, que 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 aos sítios ativos das enzimas produzidas pela bactéria. O espectro anti- β -lactamase destes inibidores incluem enzimas transferíveis mediadas por plasmídios 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 farmacocinética e química similares as 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, microrganismos contra os quais a maioria das cefalosporinas exibe pouca ou nenhuma atividade. A ligação do sulbactam a PBP2 destes organismos concede a atividade intrínseca da bactéria (LEVIN, 2002). Mas apesar desta atividade ser bem conhecida só tem sido levada em conta recentemente na prática clínica (CORBELLA et al., 1998). A maioria das espécies de *Acinetobacter* permanece suscetível a ampicilina/sulbactam. Estudos recentes no Brasil e Itália confirmam elevada taxa de suscetibilidade de *Acinetobacter* spp a

ampicilina/sulbactam. Os grandes estudos multicêntricos relatam suscetibilidade de em média 81 a 100% (LEVIN, 2002). CORBELLA et al. (1998) avaliaram ampicilina/sulbactam comparado a sulbactam sozinho no tratamento de infecções por *A. baumannii* multiresistente. Segundo seus resultados a atividade clínica da combinação é atribuível à atividade antimicrobiana do sulbactam, e sulbactam sozinho pode ser clinicamente efetivo contra *A. baumannii* multiresistente (CORBELLA, 1998).

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, mas o mecanismo molecular exato de toxicidade ainda não é claro (OUDERKIRK et al., 2003).

Polimixinas são um grupo de peptídeos policatiônicos naturalmente sintetizados pelo *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 a morte da célula. Estas drogas atravessam a membrana externa bacteriana através de uma substituição competitiva de cátions divalente por policátions, os quais 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 a polimixina B e E tem uso terapêutico avançado. Desde 1980 outros agentes antimicrobianos menos tóxicos foram disponibilizados, e o uso clínico das polimixinas foi limitado a formulações tópicas para tratamentos de pele, ouvido e olho. Formulações tópicas de polimixina B também têm sido usadas de modo profilático na prevenção de infecções em pacientes neutropênicos ou com fibrose cística. Recentemente, o surgimento de isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp multiresistentes causando infecções tem renovado a indicação terapêutica potencial do uso parenteral de polimixinas (GALES et al., 2001a).

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 ação antimicrobiana da colistina é pouco entendida, mas a membrana da célula bacteriana é interrompida pela ligação da droga a fosfolipídios ácidos no tecido mamário, onde não há atividade antimicrobiana mas pode justificar os níveis detectáveis da forma livre que podem ser liberados lentamente dos sítios de ligação. Colistina não tem efeito contra bactérias gram-positivas, tem um efeito antifúngico insignificante, e é efetiva contra bacilos gram-negativos. A toxicidade é uma importante referência a colistina, e ela nunca foi a primeira escolha para tratamento de infecções por gram-negativos por causa desta referência, apesar da toxicidade não ter sido reconhecida inicialmente. Nefrotoxicidade é 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, prejuízo renal severo com danos residuais ocorre com maior frequência. Doses para pacientes com insuficiência renal devem ser ajustadas. Como a colistina é excretada principalmente pelos rins, elevados níveis sanguíneos da droga podem mais tarde prejudicar a função renal (LEVIN, 1999). 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 carbapenems seria esperado quando a resistência aos carbapenems é pela proteína de porina deficiente. O sinergismo pode não ser evidente se o microrganismo possuir atividade de carbapenemases significativa por β -lactamase de classe B (YOON et al., 2004).

Imipenem ou meropenem são geralmente considerados os antimicrobianos de escolha no tratamento de infecções causadas por *A.baumannii*; porém, a resistência a estes agentes está aumentando. Dados recentes sugerem que o sulbactam, componente de ampicilina/sulbactam, é clinicamente efetivo contra

isolados resistentes a carbapenems; mas há poucos dados para guiarem a seleção de agentes para o tratamento de isolados resistentes tanto aos carbapenems quanto ao sulbactam. Para tais isolados, tetraciclinas podem ser uma opção de tratamento viável baseada na boa atividade *in vitro* em alguns centros e o sucesso em modelos animais de pneumonia por *A. baumannii*. 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* multiresistente. Seis dos sete pacientes foram tratados com sucesso. Estes resultados sugerem que as tetraciclinas podem ser uma opção de tratamento efetiva (WOOD et al., 2003). Dados do estudo SENTRY também demonstram boa atividade *in vitro* da tetraciclina (inibiu 57,1% - 58,8% em concentração $\leq 4\mu\text{g/mL}$) contra *Acinetobacter* spp (GALES et al., 2001b).

Um grupo de peptídeos naturais e sintéticos a partir de uma variedade de fontes tem demonstrado atividade *in vitro* quando testados contra isolados nosocomiais multiresistentes de *A.baumannii*. Um destes peptídeos, designado “proteína de aumento de permeabilidade/bactericida” (BPI), tem matado 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 multiresistentes de *Acinetobacter* (URBAN et al., 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

A análise do perfil de resistência frente a todos os isolados de *A. baumannii* no período de outubro de 2002 a maio de 2005 foi realizada através de um levantamento de dados retrospectivo sobre a atividade dos antimicrobianos testados na rotina da Seção de Bacteriologia do HC-UFPR. Os dados foram obtidos a partir de um relatório dos resultados do teste de disco difusão (DD).

Foram estudados 229 isolados de *Acinetobacter baumannii* multiresistentes, ou seja, sensíveis a polimixina B, suscetibilidade variável a ampicilina/sulbactam, resistente aos carbapenems e demais antimicrobianos testados pelo método de DD. Os isolados foram provenientes de amostras clínicas enviadas a Seção de Bacteriologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), no período citado acima. E compreende vários materiais, entre os quais estão aspirado traqueal, lavado broncoalveolar (LBA), líquido, sangue, cateter, líquido peritoneal, urina e outros (abscesso, biópsia, inserção de cateter, líquido abdominal, mini-bal) . As clínicas envolvidas no estudo foram UTI-adulto, serviço de emergência clínica adulto (SEC-ad.), ortopedia, urologia, clínica médica masculina (CMM) e feminina (CMF), infectologia, UTI-SEC, cirurgia do aparelho digestivo, neurologia, neurocirurgia, transplante hepático, risco intermediário, nefrologia, UTI-cardiológica, UTI-pediátrica, CTI adulto e pronto atendimento. Os isolados foram armazenados em tubo criogênico contendo BHI com 10% de glicerol, em freezer -80 °C.

As amostras selecionadas já haviam sido identificadas por testes bioquímicos de rotina segundo manual da ASM (YORK et al., 2004) e antibiograma pela metodologia de Kirby-Bauer (NCCLS 2003: Document M7-A6) na Seção de Bacteriologia do HC-UFPR seguindo os critérios de interpretação estabelecidos pelo NCCLS 1981: Document M2-A2 S2, NCCLS 2003: Document M2-A8 e CLSI 2005: Document M100-S15.

Os isolados foram submetidos a uma série de provas bioquímicas para confirmação da identificação da espécie. A série bioquímica utilizada (tabela 1) foi estabelecida por MAC FADDIN, 2000, compreendendo provas relevantes para a identificação do microrganismo em estudo. Com o objetivo de identificar a espécie *A. baumannii*.

TABELA 1 - IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA *Acinetobacter baumannii*

| TESTES | <i>A.baumannii</i> | <i>A.calcoaceticus</i> | <i>A.haemolyticus</i> | <i>A.johnsonii</i> | <i>A.junii</i> | <i>A.lwoffii</i> |
|-----------------------------------|--------------------|------------------------|-----------------------|--------------------|----------------|------------------|
| Motilidade | - | - | - | - | - | - |
| Catalase | + | + | + | + | + | + |
| Oxidase | - | - | - | - | - | - |
| MacConkey | G | G | G | G | G | G |
| NO ₃ – NO ₂ | - | - | - | - | - | - |
| 44 °C | G | NG | NG | NG | NG | NG |
| Hemólise | - | - | + | - | - | - |
| Citrato | + ^a | + | V ⁺ | + | V | - |
| Hid Esculina | - | - | - | - | - | - |
| Liq Gelatina | - | - | V ⁺ | - | - | - |
| Malonato | V ⁺ | + | - | V | - | - |
| Arginina Dh | V ⁺ | + | V ⁺ | V | V ⁺ | - |
| Lisina Dc | - | - | - | - | - | - |
| Ornitina Dc | V ⁺ | + | - | V | - | V |
| Fenilalanina | V | + | - | - | - | - |
| Glicose | V ⁺ | A | V | - | - | V |

LEGENDA: V: reação variável; V: variável geralmente negativo; V⁺: variável geralmente positivo; G:crescimento; NG: sem crescimento. ^a Todos as amostras com exceção de duas auxotróficas; Dh, dehidrolase; Dc, descarboxilase; Hid, hidrólise; Liq, liquefação.

FONTE: MACFADDIN, 2000.

4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM): MÉTODO DE ÁGAR DILUIÇÃO

4.2.1 Agentes antimicrobianos

Os sais antimicrobianos utilizados (tabela 2) apresentavam nome genérico da droga no rótulo, bem como sua potência e a data de vencimento. Os sais foram armazenados seguindo as instruções do fabricante, num dessecador. A equação a seguir foi utilizada para determinar a quantidade necessária para a solução padrão:

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

TABELA 2 - CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE DO TESTE DE CIM SEGUNDO O CLSI PARA AMOSTRAS DE *A.baumannii* E CEPAS CONTROLE

| ANTIMICROBIANOS | 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>P. aeruginosa</i> 27853 ($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--|--|
| Amicacina | ≤ 16 | 32 | ≥ 64 | 0,5 – 4 | 1 – 4 |
| Aztreonam | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 | 0,06 – 0,25 | 2 – 8 |
| Ciprofloxacina | ≤ 1 | 2 | ≥ 4 | 0,004 – 0,015 | 0,25 - 1 |
| Ceftazidima | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 | 0,06 – 0,5 | 1 - 4 |
| Cefepime | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 | 0,015 – 0,12 | 1 - 8 |
| Gentamicina | ≤ 4 | 8 | ≥ 16 | 0,25 - 1 | 0,5 – 2 |
| Imipenem | ≤ 4 | 8 | ≥ 16 | 0,06 – 0,25 | 1 – 4 |
| Meropenem | ≤ 4 | 8 | ≥ 16 | 0,008 – 0,06 | 0,25 - 1 |
| Pip./Tazobactam | $\leq 16/4$ | 32/4-64/4 | $\geq 128/4$ | $\frac{1}{4}$ - 4/4 | $\frac{1}{4}$ - 8/4 |
| Polimixina B | ≤ 2 | | ≥ 4 | 0,25 - 2 | 0,25 - 2 |
| Sulfa/Trimetoprim | $\leq 38/2$ | | $\geq 76/4$ | < 9,5/0,5 | 152/8 – 608/32 |
| Amp/Sulbactam | $\leq 8/4$ | 16/8 | $\geq 32/16$ | 2/1 – 8/4 | - |

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

FONTE: CLSI, 2005

As soluções padrão de agente antimicrobiano foram preparadas em concentrações de três diluições acima da concentração considerada resistente (tabela 3). As soluções padrão esterilizadas foram acondicionadas em frascos de polietileno, selados cuidadosamente e armazenados a temperatura de -80°C . As soluções padrão da maioria dos agentes antimicrobianos podem ser armazenadas a -60°C , ou menos, durante seis meses, ou mais, sem perda significativa de atividade.

TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES ESTOQUE E CONCENTRAÇÕES TESTADAS PARA AMOSTRAS DE *A. baumannii*

| ANTIMICROBIANOS | CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE (µg/ml) | INTERVALO DAS CONCENTRAÇÕES (µg/ml) |
|-------------------|---|-------------------------------------|
| Amicacina | 25600 | 0,5 - 512 |
| Aztreonam | 12800 | 0,06 - 256 |
| Ciprofloxacina | 1600 | 0,004 - 32 |
| Ceftazidima | 12800 | 0,06 - 256 |
| Cefepime | 12800 | 0,015 - 256 |
| Gentamicina | 6400 | 0,25 - 128 |
| Imipenem | 6400 | 0,06 - 128 |
| Meropenem | 6400 | 0,008 - 128 |
| Pip./Tazobactam | 51200/4 | 1/4 - 1024/4 |
| Polimixina B | 800 | 0,125 - 8 |
| Sulfa./Trimetopim | 30400/1600 | 9,5/0,5 - 608/32 |
| Amp./Sulbactam | 12800/6400 | 2/1 - 256/128 |

4.2.2 Diluição em Placas de Ágar

As diluições da solução antimicrobiana foram acrescentadas em ágar fundido que se permitiu chegar ao equilíbrio em banho-maria a temperaturas de 45 a 50 °C. O ágar e a solução antimicrobiana foram misturados completamente e a mistura colocada em placas de Petri plásticas descartáveis numa superfície até se obter uma camada de ágar de 3-4 mm de profundidade. Após a solidificação do ágar a temperatura ambiente as placas foram armazenadas em sacos de plástico a temperatura de 2-8 °C, para utilização posterior. Como as placas foram armazenadas a temperaturas de 2 a 8 °C, foram mantidas a temperatura ambiente até chegar ao equilíbrio antes de serem usadas.

4.2.3 Inóculo para Testes de Diluição

O inóculo, tanto dos isolados testados quanto dos controles (*E. coli* 25922, *P. aeruginosa* 27853), foi preparado fazendo-se uma suspensão direta, em solução salina, de colônias isoladas selecionadas numa placa de ágar de 18 a 24 horas. Utilizou-se o ágar TSA, conforme recomendado um meio não seletivo. A suspensão

foi ajustada com auxílio de aparelho fotométrico, em absorvância de 625nm para que sua turbidez coincida com a da solução padrão MacFarland de 0,5.

4.2.4 Padronização do Inóculo

As culturas ajustadas ao padrão MacFarland 0,5 contêm $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, sendo o inóculo final necessário de 10^4 UFC por spot de 5 a 8mm de diâmetro. O aplicador utilizado tem pontas de 3mm que aplicam $2\mu\text{L}$, assim, a suspensão de MacFarland 0,5 foi diluída 1:10 em solução salina esterilizada para obter uma concentração de 10^7 UFC/mL. O inóculo final em ágar teve, então, aproximadamente 10^4 UFC por spot.

4.2.5 Diluição em Ágar

Foram distribuídas alíquotas de $100\ \mu\text{L}$ das amostras diluídas (10^7 UFC/mL) em placas de ELISA de 96 poços por um multi-inoculador com 96 pinos. As placas de ágar foram marcadas para orientar os pontos de inóculo.

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 em temperatura ambiente até que a umidade nos pontos de inóculo tenha sido absorvida pelo ágar. A seguir, as placas foram invertidas e incubadas, a 35°C , por um período de 16 a 20 horas.

4.2.6 Determinação dos Pontos Finais nos Testes de Diluição em Ágar

As placas foram colocadas numa superfície escura, não refletiva, para determinar os pontos finais. A CIM é registrada como a menor concentração do

agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento, descartando qualquer colônia única ou turvação leve causada pelo inóculo. Com trimetoprim e as sulfonamidas, os antagonistas no meio podem permitir um pequeno crescimento e, portanto, o ponto final foi lido na concentração em que houve uma redução de 80%, ou mais, no crescimento, em comparação com o controle (NCCLS, 2003: Document M7-A6).

4.3 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM AMOSTRAS DE *A. baumannii*

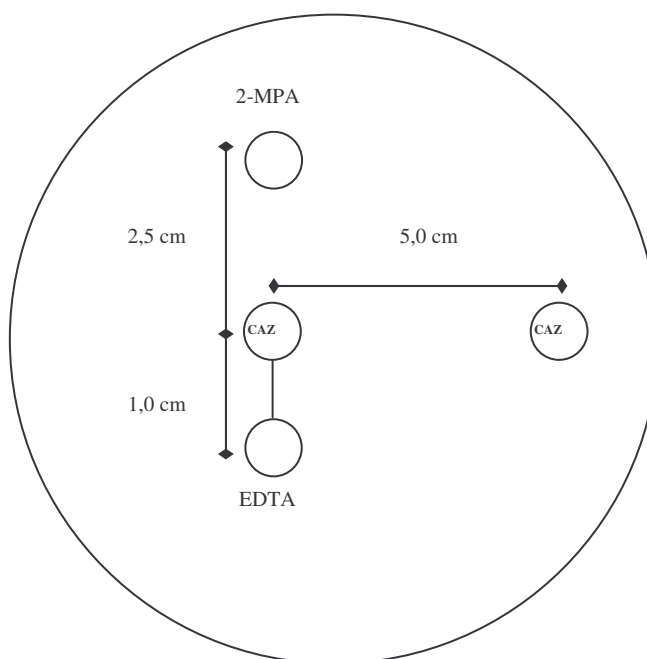
4.3.1 Detecção Fenotípica de Metallo- β -lactamase

Uma suspensão bacteriana de cada amostra de *A. baumannii* foi preparada com turbidez correspondente a 0,5 da escala de MacFarland, com auxílio de aparelho fotométrico em absorvância de 625 nm. A suspensão foi semeada com *swab* em placa com ágar Mueller-Hinton, seguindo o mesmo procedimento padronizado para disco difusão (NCCLS, 2003: Document M2-A8) . Dois discos de ceftazidima (CAZ, 30 μ g) foram colocados na placa a uma distância de 4 a 5 cm. Um disco de papel filtro (disco blank), ao qual foi adicionado 3 μ L de uma solução pura de 2-MPA, foi colocado a 2,5 cm (centro a centro) de um dos discos de CAZ. A outro disco de papel filtro foi adicionado 5 μ L de uma solução de EDTA a 100 mM, o qual foi posicionado a 1,0 cm (centro a centro) do disco de CAZ (ARAKAWA et al., 2000). O posicionamento dos discos está ilustrado na figura 1.

Para controle do procedimento foi utilizado um isolado de *Pseudomonas putida* produtor de IMP-1 gentilmente cedido pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC).

As placas foram incubadas a 35 °C por 18-24 hs.

FIGURA 1 - MODELO ESQUEMÁTICO DO POSICIONAMENTO DOS DISCOS PARA PESQUISA DE M β L PELO TSDD



NOTA: Modelo esquemático das distâncias entre o substrato e os inibidores sugeridos para a detecção fenotípica de M β L pelo TSDD. CAZ, ceftazidima; EDTA, ácido etilenodiaminotetracético; 2-MPA, ácido 2-mercaptopropiônico

O aumento na zona de inibição na área entre o disco de 2-MPA, e/ou o de EDTA, e o disco de CAZ em comparação com a zona de inibição do disco de CAZ foi interpretado como resultado positivo (figura 2) (YAN et al., 2004). Enquanto, a inalteração no halo de inibição de crescimento da bactéria testada foi interpretada como resultado negativo (figura 3). O disco de CAZ afastado dos demais foi utilizado para visualização da inibição sem influência dos inibidores da enzima.

FIGURA 2 - ILUSTRAÇÃO DE RESULTADO POSITIVO PARA O TSDD



LEGENDA: EDTA, ácido etilenodiaminotetracético;
2-MPA, ácido 2-mercaptopropiônico;
CAZ 30, ceftazidima 30 mg

FIGURA 3- ILUSTRAÇÃO DE RESULTADO NEGATIVO PARA O TSDD



LEGENDA: EDTA, ácido etilenodiaminotetracético;
2-MPA, ácido 2-mercaptopropiônico;
CAZ 30, ceftazidima 30 mg

4.3.2 Detecção Genotípica de Metallo- β -lactamase e Oxacilinase

Para a extração do DNA bacteriano, as amostras foram subcultivadas em TSA e incubadas por 18-24 hs a 37°C. Após isolamento de colônias puras, foi feita uma suspensão bacteriana densa de cada amostra em um tubo tipo *ependorf*, contendo 500 μ L de água ultrapura esterilizada. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura de 100°C por 15 minutos. Após este período, necessário para a lise bacteriana, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Uma alíquota (200 μ L) do sobrenadante foi removida para tubos de *ependorf* e estocada a 4°C até o uso. Foram utilizados 2 μ L desse sobrenadante para a amplificação do DNA. Em fluxo laminar, foi preparada uma solução mãe (*master mix*) contendo: água deionizada estéril, solução MgCl₂ 50 mM, tampão da taquipolimerase 10x, dinucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e dCTP 10mM, enzima de taquipolimerase (2,5U), e 50 ng/ μ L do oligonucleotídeo iniciador (*primer*) da fita sentido (*sense*) e da fita anti-sentido (*anti-sense*). A solução mãe (*master mix*) foi mantida a aproximadamente 4°C durante seu preparo e, após leve agitação, 23 μ L foi transferido para cada tubo de amplificação, aos quais foram adicionados 2 μ L do DNA bacteriano extraído previamente. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados e as condições de termociclagem encontram-se descritos a seguir.

A amplificação do gene *bla*_{IMP-1} utilizou o iniciador da fita sentido (*sense*) 5' CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC 3' e da fita anti-sentido (*anti-sense*) 5' GAACAACCAGTTTTGCCTTACC 3' (POIREL et al., 2000; OSANO et al., 1994). As condições de amplificação, realizada em aparelho da Eppendorff®, foram as seguintes: dois minutos a 95°C e dois minutos a 94°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 33 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 55°C (anelamento), quatro minutos a 72°C (extensão). Os produtos da PCR foram mantidos a 4°C até serem utilizados. Como controles positivos e negativos foram utilizadas amostras de *P. putida* produtora de IMP-1 e *P. aeruginosa* 27853, respectivamente.

A amplificação do gene *bla*_{SPM-1} utilizou o iniciador da fita sentido 5' CCTACAATCTAACGGCGACC 3' e da fita anti-sentido 5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 3' (TOLEMAN et al., 2002). As condições de

amplificação, realizada em aparelho da Eppendorff[®], foram: cinco minutos a 95 °C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos por 30 ciclos de um minuto a 94 °C (desnaturação), um minuto a 40 °C (anelamento). Um minuto a 38 °C (extensão) e cinco minutos de incubação a 68 °C. Os produtos da PCR foram mantidos a 4 °C até serem utilizados. Como controle positivo foi utilizada a amostra de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 (gentilmente cedida pelo LEMC) e como controle negativo a cepa de *P. aeruginosa* 27853.

A amplificação do gene *bla*_{VIM-1} utilizou os iniciadores da fita sentido 5'- TCTACATGACCGCGTCTGTC-3' e da fita anti-sentido 5'- TGTGCTTTGACAACGTTTCGC-3', e do gene *bla*_{VIM-2} fita sentido 5'-ATGTTCAAACCTTTTGAGTAGTAAG-3' e fita anti-sentido 5'-CTACTCAACGACTGAGCG-3' (SADER, 2005). A amplificação foi realizada em aparelho da Eppendorff[®] sob as seguintes condições: cinco minutos a 94 °C (desnaturação inicial); 30 ciclos de 94 °C por 25 segundos (desnaturação), 52 °C de 40 segundos (anelamento), e 72 °C por 50 segundos (extensão do *primer*); e uma elongação final a 72 °C por seis minutos. Os produtos da PCR foram mantidos a 4 °C até a utilização. Como controles positivo e negativo foram usadas cepas de *P. aeruginosa* produtora de VIM-1 e de VIM-2 (gentilmente cedida pelo LEMC) e de *P. aeruginosa* 27853, respectivamente.

Para a amplificação do gene *bla*_{OXA-23} foi utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores 5' GATCGGATTGGAGAACCAGA 3' e 5' ATTTCTGACCGCATTTCAT 3' (WOODFORD et al., 2006). A amplificação foi realizada em aparelho da Eppendorff[®] sob as seguintes condições: cinco minutos a 94 °C (desnaturação inicial); 30 ciclos de 94 °C por 25 segundos (desnaturação), 52 °C de 40 segundos (anelamento), e 72 °C por 50 segundos (extensão do *primer*); e uma elongação final a 72 °C por seis minutos. Os produtos da PCR foram mantidos a 4 °C até a utilização. Como controles positivo e negativo foram usadas cepas de *A. baumannii* 6B92 e de *A. baumannii* sensível a carbapenem isoladas no período do estudo, respectivamente.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5X (89 mM Tris-Borato e 2mM EDTA pH 8,0). Adicionou-se brometo de etídio (2 µl) no preparo do gel. Misturou-se 8 µL de tampão de corrida

(50mM EDTA pH 8, 25% ficol, 0,25% azul de bromofenol) a 2 μ L do produto de PCR de cada amostra. A mesma proporção foi mantida para o marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen[®]). O gel foi carregado com 10 μ l de cada mistura (tampão de corrida e amostra) e submetido à eletroforese sob voltagem constante de 3V por cm. Depois da corrida o gel foi visualizado e fotografado contra luz ultravioleta (320nm) em transiluminador.

4.3.3 Restrição Enzimática

Foram seguidas as orientações do fabricante para a reação de restrição com a enzima *Hind* III (Invitrogen[®]).

Em tubo tipo *ependorf* foram misturados 1 μ L da enzima a 7 μ L de água mili-Q, 2 μ L de tampão da enzima e 10 μ L de produto de PCR de cada amostra. Os tubos foram mantidos a 37 °C *overnight*. O produto foi visualizado em gel de agarose sob as mesmas condições que os produtos de PCR.

4.3.4 Seqüenciamento do Produto Amplificado

As amostras foram seqüenciadas no laboratório ALERTA da disciplina de Doenças infecciosas e parasitárias da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (Unifesp/EPM), com o apoio da Dra. Ana Cristina Gales, que gentilmente disponibilizou os insumos e a infra-estrutura necessários para a realização desse método.

4.3.4.1 Purificação do Produto de PCR

O produto de PCR dos genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{IMP-1} foram purificados com o “Kit Concert Rapid PCR Purification System” (Life Technologies, Valencia, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. Após a purificação do produto foi realizada eletroforese para quantificar o DNA por meio de comparação visual a outro gel com quantidades conhecidas de DNA (controle do Kit de seqüenciamento), sendo

avaliados o tamanho e a intensidade das bandas formadas. Foi realizada a diluição da amostra quando necessária.

4.3.4.2 Seqüenciamento

O DNA foi seqüenciado pelo método de terminação de cadeia com dideoxynucleotídeos (dDNTPs) e revelado com corantes fluorescentes (Big Dye® Applied biosystems). Para cada teste foram realizadas duas reações, uma para a fita sentido e outra para a fita anti-sentido. A reação de seqüenciamento foi preparada em dois tubos de microcentrífuga, utilizando-se de 2 a 10 µL da amostra purificada, conforme a quantidade de DNA presente nas mesmas.

Os iniciadores utilizados foram os mesmos da PCR, porém numa concentração menor (5 pM) e em reações separadas. O volume final da reação foi de 20 µL: 4 µL da mistura de reação Big Dye, 4 µL de tampão 2,5 X concentrado, 2 µL do primer e 10µ L da amostra pura ou diluída com água ultrapura.

Depois de preparada a reação, os tubos foram colocados em termociclador com o seguinte programa: um ciclo de 94°C por 2 minutos, 96°C por 10 segundos, 50°C por 30 segundos e extensão final de 60°C por 4 minutos.

4.3.4.3 Precipitação de DDNTPs não incorporados

Ao final da reação de PCR o produto foi precipitado para eliminação dos DDNTPs marcados que não foram incorporados na reação. O produto do seqüenciamento foi transferido para novos tubos, foram adicionados 80 µL de isopropanol a 75%, homogeneizados em vortex e centrifugados a 12000 rpm por 30 minutos, a 22°C. O isopropanol foi removido com pipeta. O passo seguinte foi adicionar 100 mL de etanol a 70%, homogeneizar em vortex e centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos. O etanol foi removido, as amostras secas por 1 minuto em termo-bloco a 94°C. Foram adicionados 20 µL de TSR (polímero que acompanha o Kit de seqüenciamento). As amostras foram submetidas a um choque térmico: termo-bloco 1 minuto a 94°C e, em seguida, os tubos foram colocados por 3 minutos no freezer a -20°C.

4.3.4.4 Determinação da Seqüência do DNA

As amostras foram transferidas para os tubos de seqüenciamento e estes colocados no aparelho ABI BioPrism 310 (Foster City, Califórnia, EUA). A interpretação análise e edição das seqüências foram realizadas com o auxílio do “software Sequencing Analysis” do aparelho ABI BioPrism 310.

5 RESULTADOS

Foi realizado um levantamento de dados retrospectivos sobre a suscetibilidade dos antimicrobianos frente aos isolados de *A. baumannii*, submetidos ao método de DD na Seção de Bacteriologia, no HC-UFPR referente ao período de outubro de 2002 a maio de 2005. Observou-se que o perfil de resistência foi elevado, variando de 28,1% para piperacilina/tazobactam a 78,7% para sulfametoxazol/trimetropim, com exceção da polimixina B, para o qual houve baixa resistência, sendo de 0,4% (n=3). Entre os carbapenems a percentagem de resistência do meropenem (70,5%) foi superior a do imipenem (50,1%). Outra opção terapêutica, ampicilina/sulbactam, apresentou 45,9% de resistência.

Dentre o total de isolados de *A. baumannii* referentes ao período estudado foram selecionados 229 amostras multiresistentes. Denominou-se por multiresistentes os isolados que eram resistentes aos carbapenems, suscetibilidade variável a ampicilina/sulbactam e sensíveis a polimixina B. Na figura 4 está representada a distribuição dos isolados por unidade clínica incluída no estudo. A unidade clínica com o maior número de amostras foi a UTI-adulto (135/229), seguida por SEC-adulto (42/229), UTI-SEC (11/229), CMF (8/229), e demais unidades (33/229). Os sítios anatômicos a partir dos quais o microrganismo foi isolado estão representados na figura 5. Aspirado traqueal foi o sítio de isolamento mais frequente, responsável por 50% (113/229) dos isolados. Outros sítios importantes foram sangue (47/229), urina e cateter (19/229), LBA (9/229), líquido (7/229), líquido peritoneal (5/229) e outros sítios (10/229). O trato respiratório inferior (LBA e aspirado traqueal) respondeu por mais da metade das amostras (122/229).

FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS DE *A. baumannii* MULTIRESISTENTES POR UNIDADE CLÍNICA DO HC-UFPR

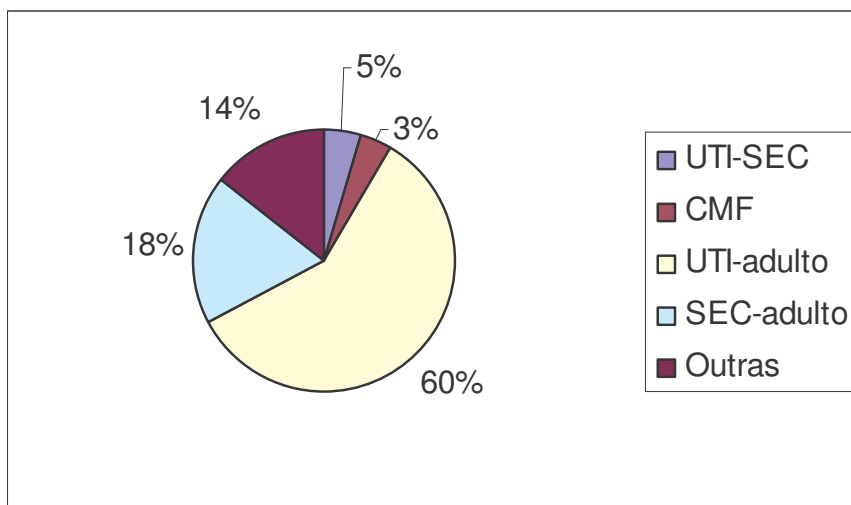
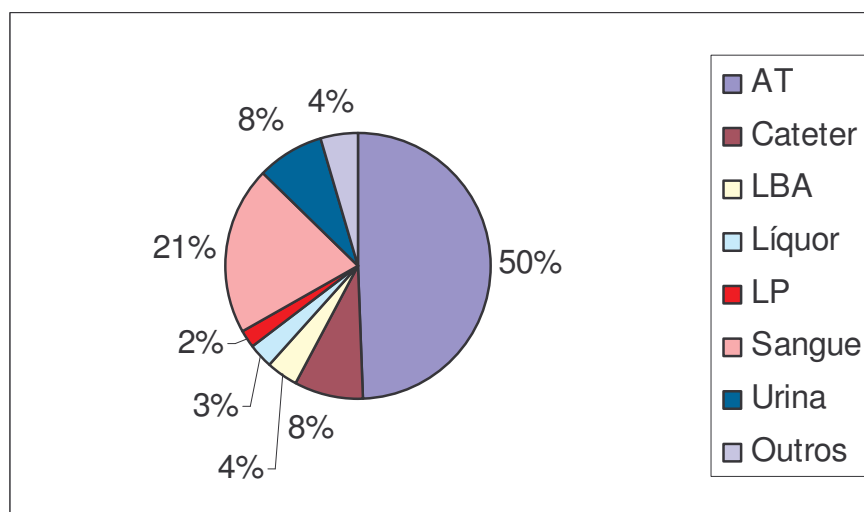


FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE *A. baumannii* MULTIRESISTENTES POR SÍTIO ANATÔMICO



LEGENDA: AT, aspirado traqueal; LBA, lavado broncoalveolar; LP, líquido peritoneal

A caracterização bioquímica dos isolados confirmou os resultados da identificação realizada anteriormente no Setor de Bacteriologia do HC-UFPR. As provas bioquímicas motilidade negativa, oxidase negativa, fermentação de glicose negativa e crescimento a 44 °C foram relevantes para identificar 100% das amostras como *A. baumannii*.

Na tabela 5 estão demonstrados os resultados da CIM pelo teste de AD para doze diferentes antimicrobianos frente aos isolados de *A. baumannii*. Observou-se

100% de resistência aos antimicrobianos ampicilina/sulbactam (SAM), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP) e cefepime (CPM). Para os antimicrobianos sulfametoxazol/trimetopim (SUT), amicacina (AMI), meropenem (MEM), gentamicina (GEN), imipenem (IMP) e piperacilina/tazobactam (PTZ) a percentagem de resistência também foi elevada, sendo de 86,90%, 88,65%, 96,94%, 97,38%, 97,82% e 99,56%, respectivamente. Polimixina B foi o antimicrobiano para o qual houve maior percentagem de suscetibilidade (98,69% - 226/229), e conseqüentemente o que apresentou maior potência, CIM₅₀ 0,5 µg/mL, duas concentrações abaixo do ponto de corte, e atividade CIM₉₀ 1 µg/mL. Os demais antimicrobianos apresentaram potência e atividade muito semelhantes, pois para a maioria dos antimicrobianos tanto CIM₅₀ quanto CIM₉₀ corresponderam à mesma concentração, e para poucos deles a diferença foi de uma ou duas diluições.

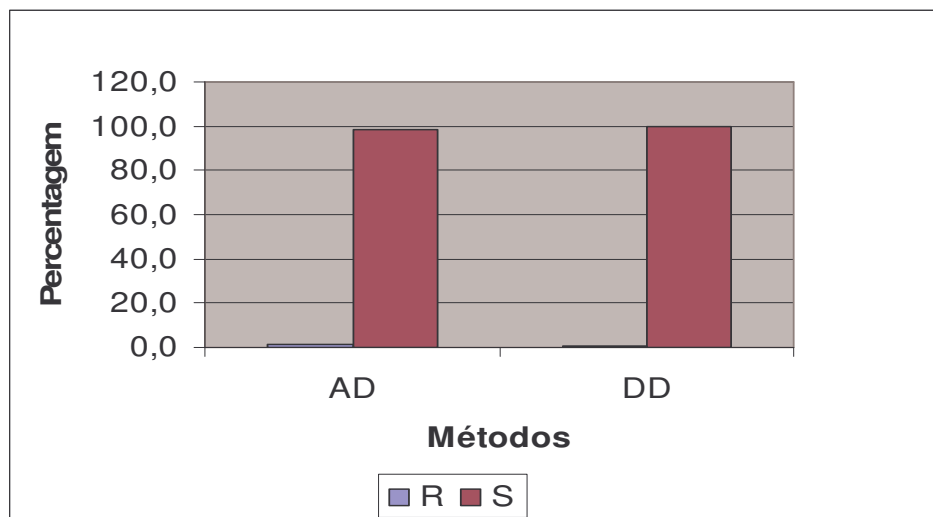
TABELA 4 – CIM₅₀, CIM₉₀ E ATIVIDADE DE 12 ANTIMICROBIANOS TESTADOS FRENTE AOS ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* MULTIRESENTES ISOLADOS NO HC-UFPR

| ANTIMICROBIANO | CIM; µg/mL | | RESULTADO; % | |
|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|------------|
| | CIM ₅₀ | CIM ₉₀ | Sensível | Resistente |
| Amicacina | 64 | 64 | 11,35 | 88,65 |
| Amp./Sulbactam | 64/32 | 64/32 | 0 | 100 |
| Aztreonam | 128 | >256 | 0 | 100 |
| Ceftazidima | >256 | >256 | 0 | 100 |
| Ciprofloxacina | >32 | >32 | 0 | 100 |
| Cefepime | 256 | >256 | 0 | 100 |
| Pip./Tazobactam | 256/4 | 512/4 | 0,44 | 99,56 |
| Gentamicina | >128 | >128 | 2,62 | 97,38 |
| Imipenem | 128 | 128 | 2,18 | 97,82 |
| Meropenem | 64 | 64 | 3,06 | 96,94 |
| Polimixina B | 0,5 | 1 | 98,69 | 1,31 |
| Sulfa./Trimetopim | 76/4 | 76/4 | 13,10 | 86,90 |

Analisando-se os resultados de suscetibilidade a polimixina B pelos métodos de DD e AD observam-se resultados discrepantes. No método de DD 99,6% (228/229) das amostras foram consideradas sensíveis, e 0,4% (1/229) resistentes seguindo-se os critérios estabelecidos pelo NCCLS, 1981. Porém, pelo método de

AD 98,7% (226/229) das amostras foram sensíveis e 1,3% (3/229) resistentes, segundo critérios do CLSI, 2005 (gráfico 1).

GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ENTRE OS MÉTODOS AD E DD PARA POLIMIXINA B



Os resultados dos métodos de DD e AD para polimixina B foram comparados por meio do teste de acurácia. Os dados foram plotados num gráfico, onde, no eixo das abscissas (X), encontram-se os diâmetros dos halos de inibição da polimixina B fornecidos pelo DD e, no eixo das ordenadas (Y), as CIMs, determinadas por AD, considerado o método de referência (figura 6). As discrepâncias entre os dois métodos foram classificadas em erros do tipo alfa, falsa resistência; e erros do tipo beta, falsa suscetibilidade (JEKEL, 1999). Erro do tipo alfa (falsa resistência) ocorreu em 1 caso das 229 amostras de *A. baumannii* avaliadas, enquanto o erro do tipo beta (falsa suscetibilidade) ocorreu em 3 casos.

Os valores de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo e negativo (VPP e VPN) e erros do tipo alfa e beta estão na tabela 6.

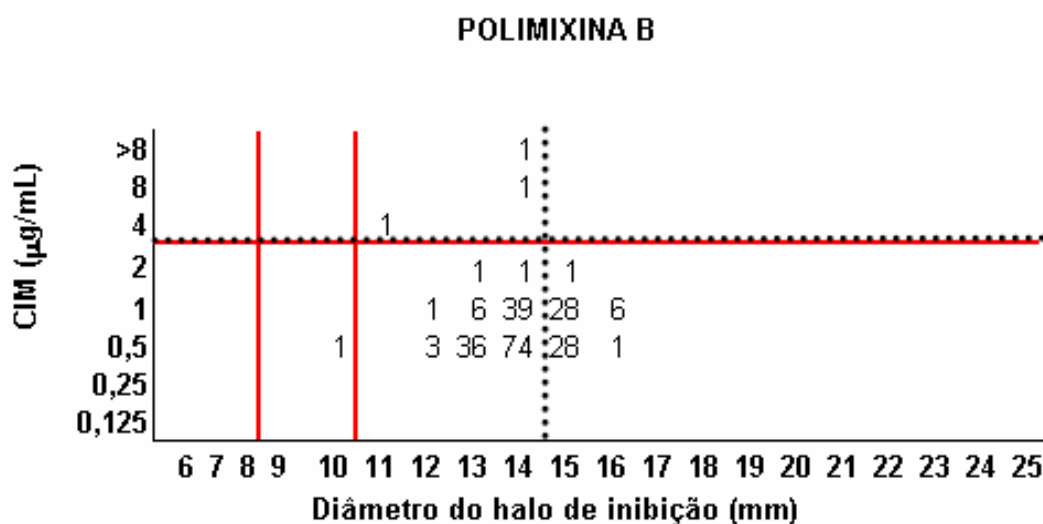
TABELA 5 - RESULTADO DO TESTE DE ACURÁCIA ENTRE OS MÉTODOS DE AD E DD PARA POLIMIXINA B

| NÚMERO DE AMOSTRAS | S (%) | E (%) | VPP (%) | VPN (%) | ERRO ALFA (%) | ERRO BETA (%) |
|--------------------|-------|-------|---------|---------|---------------|---------------|
| 229 | 0,0 | 99,6 | 0,0 | 98,7 | 0,4 | 100 |

LEGENDA: Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor preditivo positivo (VPP), Valor preditivo negativo (VPN)

Para a polimixina B 225 amostras foram consideradas sensíveis pelo DD e pelo AD, sendo 142 amostras com CIM 0,5 µg/mL, 80 amostras com CIM 1,0 µg/mL e 3 amostras com CIM 2,0 µg/mL. Uma amostra foi relatada como resistente pelo DD (10mm) e como sensível pelo AD (CIM 0,5 µg/mL). Três amostras tiveram CIM 4, 8, >8 µg/mL, concentrações nas quais o microrganismo é considerado resistente, e diâmetros de halo de 11 mm (1 amostra) e de 14 mm (2 amostras), valores de halo nos quais é considerado sensível.

FIGURA 6 - COMPARAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM mm (DD) COM A CIM EM µg/mL (AD) DA POLIMIXINA B



NOTA: As linhas contínuas representam os valores de ponto de corte contidos no NCCLS, 1981, enquanto as linhas pontilhadas representam os valores de ponto de corte da SFM, 2005 para polimixina B.

LEGENDA: SFM, Sociedade Francesa de Microbiologia.

Na tabela 7 estão apresentados os resultados da pesquisa de MβL por método fenotípico. A pesquisa de MβL por método fenotípico obteve 15,7% (36/229) dos isolados positivos, 82,1% (188/229) negativos e 2,2% (5/229) dos resultados foram inconclusivos. A percentagem de resultados positivos (14,4%) e negativos (83,4%) foi a mesma para os dois inibidores, 2-MPA e EDTA. Porém, houve casos (6/229) em que o resultado foi positivo para apenas um dos inibidores. Nestas situações o resultado foi considerado positivo, a isto se deve a diferença nos resultados, quando os inibidores são considerados individualmente e no total.

TABELA 6 - PESQUISA FENOTÍPICA DE PRESENÇA DE M β L EM AMOSTRAS DE *A. baumannii* ISOLADOS NO HC-UFPR

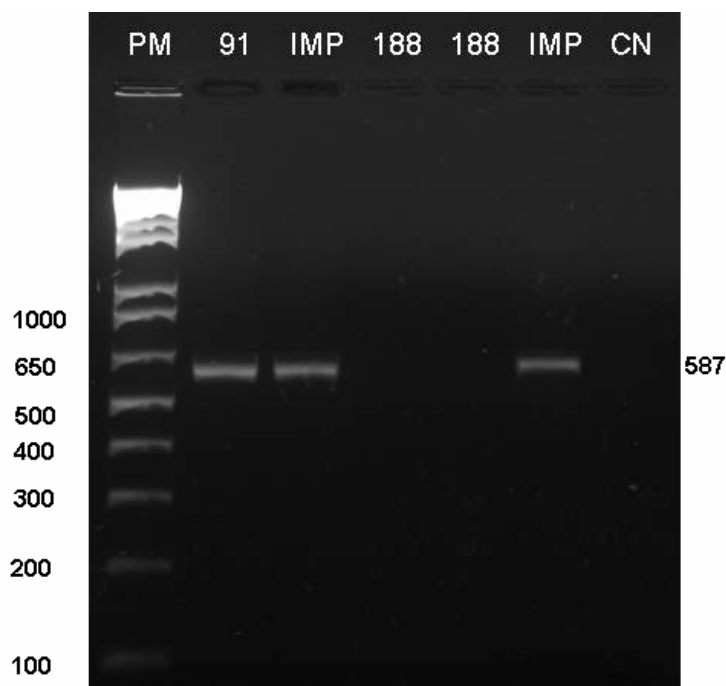
| RESULTADO | EDTA %(n) | 2-MPA %(n) | TOTAL (EDTA + 2-MPA) %(n) |
|--------------|-----------|------------|---------------------------|
| Negativo | 83,4(196) | 83,4(196) | 82,1(188) |
| Positivo | 14,4(33) | 14,4(33) | 15,7 (36) |
| Inconclusivo | 2,2(5) | 2,2(5) | 2,2(5) |

LEGENDA: EDTA, ácido etilenodiaminotetracético; 2-MPA, ácido 2-mercaptopropiônico

NOTA: Negativo, ausência de M β L; Positivo, presença de M β L

Quarenta e uma amostras de *A. baumannii* classificadas fenotipicamente como produtoras de M β L pelo TSDD foram avaliadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction* - PCR) para identificar a presença de genes que codificam a produção de M β Ls e OXA-23. Os genes pesquisados foram *bla*_{IMP-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2} e *bla*_{OXA-23}. Apenas 1 (2,44%) isolado apresentou produto de PCR compatível ao fragmento amplificado do gene *bla*_{IMP-1}, com 587 pb (figura 7). Não houve produto de PCR quando foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para os genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2}. Nas 40 amostras restantes não se confirmou o resultado obtido no TSDD. Estas amostras (40) apresentaram produto de PCR compatível ao fragmento amplificado do gene *bla*_{OXA-23} (501pb).

FIGURA 7 - PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE *bla*_{IMP-1} OBTIDOS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *A. baumannii*



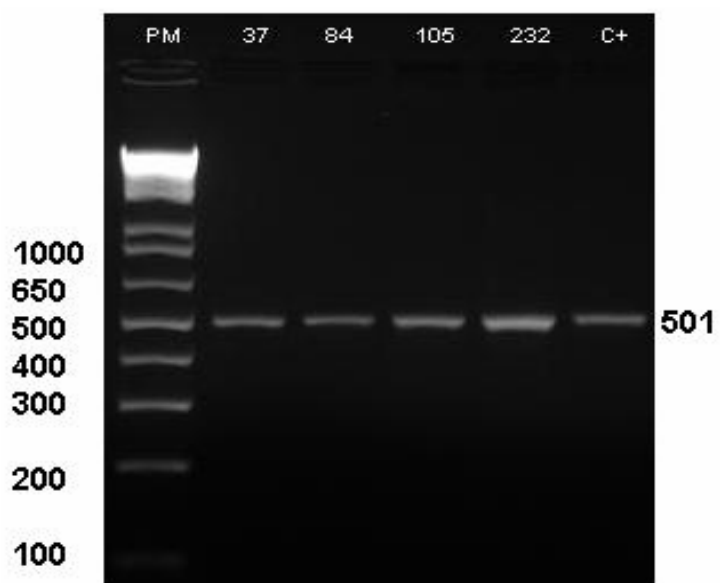
LEGENDA: Marcador de peso molecular (PM), *A. baumannii* produtor de IMP-1(91), *A. baumannii* negativo para IMP-1(188), controle positivo (IMP), controle negativo (CN)

As outras 188 amostras de *A. baumannii*, que foram negativas no TSDD, foram avaliadas por PCR para identificar a presença de oxacilinase codificada pelo gene *bla*_{OXA-23}. Obteve-se produto de PCR compatível com o fragmento amplificado do gene *bla*_{OXA-23}, com 501 pb, em 184 amostras (figura 8). Em 4 isolados não houve produto de PCR.

As 224 amostras com produtos de PCR compatíveis ao fragmento amplificado do gene *bla*_{OXA-23} foram submetidos à restrição enzimática com a enzima *Hind* III. A enzima gerou fragmentos de 110 e 390 pb em todos os produtos submetidos à reação de restrição, o que confirma a identidade da oxacilinase (OXA-23) presente nas amostras em estudo.

O produto de PCR de uma das amostras foi submetido ao seqüenciamento e a seqüência corresponde ao gene da enzima OXA-23.

FIGURA 8 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE *bla*_{OXA-23}
EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *A. baumannii*



LEGENDA: Marcador de peso molecular (PM) ; amostras de *A. baumannii* produtoras de OXA-23 (37, 94, 105, 232); C+(controle positivo)

6 DISCUSSÃO

Dados retrospectivos do levantamento sobre a atividade dos antimicrobianos a partir dos resultados do método de DD realizado na Seção de Bacteriologia demonstram que o perfil de resistência de todos os isolados de *A. baumannii* no HC-UFPR durante o período analisado foi elevado para a maioria dos antimicrobianos (28,1% a 78,7%). Esta elevada resistência associada a uma alta frequência de isolamentos mostra que *A. baumannii* multiresistente pode ser considerado um microrganismo endêmico neste hospital. Observou-se uma considerável diferença na percentagem de resistência a imipenem (50,1%) e meropenem (70,5%), que pode ser por falha na coleta dos dados. Além disso, imipenem e meropenem não foram testados para todas as amostras em todo período, e por se tratar de um hospital público há, eventualmente, falta de disco de um dos antimicrobianos. Assim, estes dados servem para ilustrar que a resistência aos carbapenems é elevada neste hospital, um dos fatos que motivou este estudo. Segundo dados do levantamento retrospectivo, é notória a suscetibilidade (99,6%) a polimixina B (NCCLS, 1981), semelhante a relatos do estudo SENTRY (99,4%) (TOGNIM et al., 2004). Dados do estudo MYSTIC sobre suscetibilidade antimicrobiana em UTI de grandes centros brasileiros relatam um perfil de resistência de 10,4% ao imipenem no ano de 2002, enquanto neste estudo foi de 50,1%. Para os demais antimicrobianos o perfil dos estudos é concordante (MENDES et al., 2005).

Pelos dados do estudo de 229 isolados de *A. baumannii* multiresistente distribuídos em relação ao sítio anatômico, observou-se que o trato respiratório responde por 54% das amostras, sangue e cateter por 29%. Ao contrário, no estudo do programa MYSTIC sangue e cateter aparecem em primeiro com 39,2% dos isolados, e trato respiratório em segundo com 25,7%. Em terceiro lugar nos dois estudos está o trato urinário com 16,7% e 8%, respectivamente (MENDES et al., 2005). A UTI-adulto confirma-se como a unidade com maior frequência de isolamentos (60%) de *A. baumannii* pelas características de seus pacientes, que são submetidos a vários procedimentos, entre eles ventilação mecânica, uso de antimicrobianos de amplo espectro e por longos períodos, entre outros. Fatores de

risco que contribuem para o elevado número de casos nesta unidade (BERGOGNE-BÉREZIN e TOWNER, 1996; CISNEROS, 2005).

Os antimicrobianos escolhidos para o teste de AD são os mais usados na prática clínica no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*. Além de englobar várias classes de antimicrobianos, como ocorre em estudos multicêntricos (TOGNIM et al., 2004).

A CIM foi elevada para todas as amostras, tanto para as amostras com teste fenotípico para M β L positivo, quanto para negativo ou inconclusivo. Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ variaram do ponto de corte para resistência a quatro diluições acima, com exceção da polimixina B, cujos valores foram duas e uma diluição abaixo, respectivamente. Em outros estudos que relatam a CIM₉₀ de isolados nosocomiais de *A. baumannii* da América Latina, porém não apenas de multiresistentes como os deste estudo, observa-se que a atividade dos antimicrobianos também é baixa (GALES et al., 2001b).

Na comparação entre os métodos de AD e DD para a polimixina B, observou-se uma elevada especificidade (99,6%), porém nenhuma sensibilidade (0%). O que gerou uma falsa resistência de 0,4%, e uma falsa suscetibilidade de 100%. A dificuldade do método de DD está em detectar a resistência, pois nas únicas três amostras resistentes pelo AD (método de referência) o teste de DD não foi capaz de identificá-las, considerando-as sensíveis. A prevalência desta resistência no estudo foi baixa, o que prejudicou a avaliação da metodologia, tornando necessário avaliar um número maior de amostras resistentes a polimixina B.

Na análise dos resultados do método de DD para polimixina B utilizou-se como critério os pontos de corte do NCCLS (1981), porque não houve liberação destes nas edições subseqüentes, inclusive na edição de 2005 que apenas reporta ponto de corte para AD. Enquanto para o AD houve atualização anual, pois métodos de diluição conferem resultados confiáveis (GALES et al., 2001a). Neste estudo foram encontrados três casos de falsa suscetibilidade (erro β = 100%) pelo DD, por isso concordou-se com o estudo de GALES et al. (2001a), o qual recomenda a utilização de métodos de diluição para avaliação da suscetibilidade a polimixina B.

A análise dos resultados da metodologia de AD e DD deste estudo, considerando-se os pontos de corte da Sociedade Francesa de Microbiologia (SFM), 2005, sofre alterações significativas em relação ao DD. O método não teria problemas de falsa suscetibilidade (erro $\beta = 0\%$), os 3 casos de resistência seriam detectados tanto pelo DD quanto pelo AD. Porém haveria uma percentagem elevada de falsa resistência (erro $\alpha = 72\%$), pois haveria 162 casos de resistência pelo DD que seriam sensíveis pelo AD. Sob o ponto de vista clínico, para o tratamento de pacientes críticos, que são os mais freqüentemente acometidos por infecções causadas por *A. baumannii* resistente aos carbapenems, é melhor falsa resistência do que falsa suscetibilidade, pois assim a falha terapêutica seria reduzida. Porém, a adoção deste critério também não é satisfatória. Assim como no estudo de GALES et al. (2001a), a sugestão de alteração do halo de inibição para polimixina B, em decorrência dos resultados falso-sensíveis (6%) com o critério estabelecido (NCCLS, 1981), não diminuiria a percentagem de falso-sensíveis. Então, as sugestões de alteração do ponto de corte para DD na tentativa de melhorar a sensibilidade do método não seriam efetivas, e a recomendação de utilização de métodos de diluição é mantida.

No teste de triagem para a presença de enzima tipo metalo- β -lactamase foi usado o TSDD. O antimicrobiano utilizado foi a ceftazidima (30 μ g), que parece ser o substrato mais apropriado para o teste, pois os produtores de IMP-1, que é a M β L mais freqüentemente presente nos isolados, geralmente demonstram elevados níveis de resistência a ceftazidima (CIM > 64 μ g/mL), e um efeito inibitório marcante dos compostos tiólicos pode ser observado (ARAKAWA et al., 2000). Como inibidores da enzima foram utilizados 2-MPA e EDTA. 2-MPA é um composto tiólico cujos resultados foram mais claros no estudo de ARAKAWA, 2000, por ser capaz de bloquear a atividade de IMP-1 mesmo em baixas concentrações. O metal quelante, EDTA, já foi utilizado com sucesso em vários testes de triagem para M β L, como por exemplo no Etest, no qual foi mais sensível (97%) do que 2-MPA (53%) (WALSH et al., 2002). As amostras do estudo preencheram os requisitos para a utilização da ceftazidima como substrato, pois pertencem a uma espécie com relatos de presença de IMP-1, e possuem CIM de 64 μ g/mL a >256 μ g/mL.

A interpretação dos resultados do teste de sinergismo de duplo-disco (TSDD) é subjetiva, pois se dá pela observação do aumento na área de inibição entre os discos. Fato que gerou dúvida na análise dos resultados de algumas amostras (5/229), tanto para EDTA quanto para 2-MPA. GALLEGO et al., 2004 também relatam em seu estudo, com isolados de *A. baumannii*, que em alguns casos houve dificuldade na interpretação dos resultados do teste com EDTA, e não pode ser valorizado de forma conveniente. Variações na preparação dos discos ou a distância entre os discos na placa variavam de forma importante o resultado. A solução de EDTA também pode interferir no crescimento bacteriano e isto alteraria o resultado (GALLEGO et al., 2004). O TSDD parece ser um método melhor de detecção de MβLs, quando comparado ao disco combinado ou ao Etest; entretanto, estudos prévios têm mostrado que o efeito de permeabilidade de membrana do EDTA pode aumentar a suscetibilidade de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp a vários antimicrobianos. Além disso, a suscetibilidade ao EDTA também parece ser comum entre estes microrganismos, como é exemplificado pelos resultados do disco de EDTA com halos de 18-22 mm no TSDD (CHU et al., 2005).

Na confirmação dos resultados do TSDD por PCR houve apenas 1 isolado (2,44%) com produto de PCR para a enzima tipo IMP, e nenhum para SPM, VIM-1 e VIM-2. A enzima tipo IMP-1 foi encontrada pela primeira vez em uma amostra clínica de *S. marcescens*, apresentando fenótipo de resistência a imipenem e cefalosporinas de amplo espectro. Durante muitos anos, a ocorrência de isolados produtores desta enzima foi restrita a países da Ásia, entretanto, atualmente, IMP-1 tem sido encontrada em diversos países e em diferentes microrganismos, tais como *Acinetobacter* spp, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*. A SPM-1 foi isolada em *P. aeruginosa*, recuperada de um paciente internado no Hospital São Paulo. O gene, que confere este novo determinante de resistência, parece estar especificamente relacionado à espécie de *P. aeruginosa*, uma vez que, até então, não foi encontrado em demais patógenos nosocomiais (MENDES et al., 2006). SPM-1 é uma MβL distinta, diferente de IMP e VIM, que representa uma enzima única nesta sub-classe (TOLEMAN, 2002; MURPHY, 2003). Apesar de não ter sido encontrada neste estudo a sub-classe VIM já foi relatada em isolados de *A. baumannii*, é capaz de hidrolisar a maioria dos β-lactâmicos com exceção ao aztreonam, e está menos

relacionada às outras metaloenzimas, compartilhando apenas 39% de homologia (OH et al., 2003; WALSH, 2005a). Outro motivo pode ser a baixa especificidade do método de triagem utilizado para as amostras deste estudo, que confirmou por PCR e seqüenciamento apenas um isolado com presença de enzima tipo IMP. As amostras não confirmadas eram na verdade portadoras do gene *bla*_{OXA-23}. Há relato de boa especificidade para o TSDD, tanto para a sub-classe IMP-1 (88,3%) quanto para a VIM-2 (99%), entretanto o número de amostras de *A. baumannii* estudadas foi pequeno (OH et al., 2003).

GALES et al., 2003 fizeram o primeiro relato de uma MβL tipo IMP em um isolado clínico de *A. baumannii* de um hospital de ensino no Brasil. Um produto de 580 pb foi amplificando com a utilização de um iniciador *bla*_{IMP-1}. Como no relato não foi feito o seqüenciamento de todo o gene, denominou-se o produto encontrado de IMP-*like*, até que o estudo do gene seja completo. Tem sido sugerido que isolados produtores de MβL têm surgido como conseqüência da pressão seletiva exercida pelos carbapenems. Entretanto, a razão exata para sua seleção ainda não é completamente entendida (GALES et al., 2003).

Carbapenemases pertencentes à classe molecular D emergem em *A. baumannii* no mundo todo, com dois sub-grupos aparentes (LIVERMORE e WOODFORD, 2000). Segundo a homologia de seus aminoácidos a enzima OXA-23 pertence ao mesmo grupo da OXA-27, com 99% de homologia, e com 60% de homologia com o grupo representado pela enzima OXA-24 (AFZAL-SHAH et al., 2001). Vários tipos já foram descobertos (DONALD et al., 2000; BOU et al., 2000b; AFZAL-SHAH et al., 2001; HÉRITIER et al., 2003; BROWN et al., 2005; POIREL et al., 2005), além dos não seqüenciados. No presente estudo optou-se por pesquisar a enzima tipo OXA-23, pois há relato anterior desta enzima no hospital em estudo (DALLA-COSTA et al., 2003). Além disso, o período analisado é subsequente ao surto relatado. Em 98,2% (224/228) dos isolados submetidos à PCR para OXA-23 houve produto compatível com o tamanho do fragmento esperado de 501 pb. Resultado que confirma o relato anterior da presença da enzima no hospital em estudo. Os primeiros casos de *A. baumannii* com resistência aos carbapenems em Curitiba são de 1999, quatorze anos depois do primeiro relato da enzima na Escócia em um isolado clínico de *A. baumannii*. Relatou-se 8 isolados de dois hospitais (HC-

UFPR, HUEC) que foram submetidos à técnica de PCR, pela qual os isolados foram confirmados como portadores da enzima OXA-23 (DALLA-COSTA et al., 2003). Já se passaram três anos desde o primeiro relato de OXA-23 no HC-UFPR, e pelos dados deste estudo pode-se observar que houve disseminação de amostras produtoras de oxacilinase. Na Ásia em 2003 ocorreu o primeiro relato de surto causado por um clone de *A. baumannii* produtor de OXA-23. Foram detectados 52 isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem de pacientes coreanos, dos quais 36 apresentavam a enzima OXA-23. A resistência ao imipenem entre os isolados foi por disseminação clonal (JEON, 2005).

Neste estudo o produto de PCR foi compatível com o esperado (501 pb), e tanto a restrição enzimática quanto o seqüenciamento do produto confirmaram a enzima como sendo OXA-23. Na seqüência deste estudo a eletroforese em campo pulsado (PFGE) será realizada para confirmar se houve expansão do clone inicial ou trata-se de uma transferência de genes de resistência. Tanto para as amostras com produto de PCR quanto para as que não produziram produto com as enzimas testadas há a possibilidade da existência de outros mecanismos de resistência como a diminuição da permeabilidade da membrana externa, mediada pela perda ou expressão reduzida das porinas, redução da afinidade da proteína de ligação da penicilina. Mecanismos que têm sido associados à resistência aos carbapenems em isolados clínicos de *A. baumannii* (BOU et al., 2000a; MENDES et al., 2006).

7 CONCLUSÕES

1. O perfil de resistência dos isolados de *A. baumannii* do HC-UFPR é elevado em comparação com outros centros, principalmente em relação aos carbapenems.
2. A CIM confirmou a elevada resistência das amostras estudadas detectada pelo método de DD.
3. A comparação entre os métodos de AD e DD para polimixina B mostrou que o método de DD tem baixa sensibilidade e apresenta elevada percentagem de resultados falso-sensíveis. Contudo, faz-se necessário um estudo com maior números de amostras resistentes a polimixina B, para que haja uma avaliação fidedigna do método.
4. O TSDD para M β L apresentou-se pouco específico neste estudo.
5. A presença de enzimas do tipo M β L em *A. baumannii* foi pouco freqüente neste estudo. Enquanto para a enzima tipo OXA-23 há elevada prevalência nos isolados estudados.
6. São necessários mais estudos para elucidar os demais mecanismos de resistência aos carbapenems presentes nos isolados de *A. baumannii* que foram analisados.

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.

AGUSTÍ, C. et al. Short-term effect of the application of selective decontamination of the digestive tract on different body site reservoir ICU patients colonized by multi-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49, p. 205-208, 2002.

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.

AYAN, M. et al. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. **J. Hosp. Infect.**, v. 54, p. 39-45, 2003.

BERGOGNE-BÉREZIN, 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.

BOU, G. Characterization of a Nosocomial Outbreak Caused by a Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Strain with Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme: High-Level Carbapenem Resistance in *A. baumannii* Is Not Due Solely to the Presence of β -Lactamases. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 9, p. 3299-3305, 2000a.

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, 2000b.

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 lwoffii*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 36, n. 2, p. 228-240, 1986.

BOUVET, P. J. M. GRIMONT, P. A. D. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, v. 140, p. 291-299, 1987.

BOUVET, P. J. M.; JEANJEAN S. Delineation of new proteolytic species in the genus *Acinetobacter*. **Res. Microbiol.**, v. 140, p. 291-299, 1989.

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.

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.

CHU, Y. W. et al. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem-EDTA disk method. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 26, p. 338-341, 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-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nation wide 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, M100-S15. Wayne, PA, 2005.

COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE (SFM). Edition de Javier, Communiqué 2005, Paris.

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.

D'AGATA, E. M. C.; THAYER, V.; SCHAFFNER, W. An Outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The Importance of Cross-Transmission. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 21, n. 9, p. 588-591, 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. 3403-3406, 2003.

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.

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.

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. 565-574, 2003.

GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 183-190, 2001a.

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. 104-113, 2001b.

GALES, A. C. et al. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagnostic Microbiol. and Infects Dis.**, v. 45, n. 7, p. 77-79, 2003.

GALLEGO, L. et al. Detección de carbapenemasas en clones de *Acinetobacter baumannii* resistentes a imipenem. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 22, n. 5, p. 262-266, 2004.

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.

GERNER-SMIDT, P.; TJERNBERG, I. *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* complex. **APMIS**, v. 101, p. 826-832, 1993.

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.

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DR. RICARDO JORGE. **Critérios do CDC para o Diagnóstico das Infecções**. Disponível em:

<http://www.insarj.pt/site/resources/images/PNCI/criterios_infec_cdc2003.pdf>

Acesso em: 17 abril 2006.

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.1938-1941, 1998.

JEKEL, F. F.; ELMORE, J. G.; KATZ, D. L. **Epidemiologia Estatística e Medicina Preventiva**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.

JEON, B. C. et al. Investigation of a Nosocomial Outbreak of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 β -Lactamase in Korea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 5, p.2241-2245, 2005.

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.

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. 284-288, 2001.

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.; DUDLEY, M. N. Antimicrobials: better use, better drugs, or both? **Curr. Op. Microbiol.**, v. 3, p. 487-488, 2000.

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

LIVERMORE, D. M. Epidemiology of antibiotic resistance. **Intensive Care Med.**, v. 26, p. S14-S21, 2000.

LIVERMORE, D. M. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36(Suppl 1), n. S11-23, 2003.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical Tests for Identifications of Medical Bacteria**. 3th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MAHGOUB, S.; AHMED, J.; GLATT, A. E. Underlying characteristics of patients harboring highly resistant *Acinetobacter baumannii*. **Am. J. Infect. Control**, v. 30, n. 7, p. 386-390, 2002.

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. E. et al. Metallo- β -Lactamases: Uma Revisão. **J. Bras. Patologia Clin.**, in press, 2006.

MURPHY, T. A. et al. Biochemical Characterization of the Acquired Metallo- β -Lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 2, p. 582-587, 2003.

NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L.; JEZEK, P. Recognition of Two Novel Phenons of the Genus *Acinetobacter* among Non-Glucose-Acidifying Isolates from Human Specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 11, p. 3937-3941, 2000.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter ursingii* sp nov. and *Acinetobacter schindleri* sp nov., isolated from human clinical specimens. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 51, n. 1891-1899, 2001.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter parvus* sp nov., a small-colony forming species isolated from human clinical specimens. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 53, p. 1563-1567, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CLSI/NCCLS). **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests**. Approved standard M2-A2 S2. Wayne, Pa, 1981.

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. USA, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CLSI/NCCLS). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.** Approved standard. 7th. ed. NCCLS document M2-A8. USA, 2003.

NORDAMMN, 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. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 22, n. 5, p. 259-61, 2004.

OSANO, E., et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, p. 71-78, 1994.

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.

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

POIREL, L. et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 4, p. 891-897, 2000.

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.

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.

QUALE, J. et al. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Endemic in New York City. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, n. 7, p. 214-220, 2003.

SADER, H. S. et al. Use of Macrorestriction Analysis to Demonstrate Interhospital Spread of Multiresistant *Acinetobacter baumannii* in São Paulo, Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 23, n. 9. p. 631-634, 1996.

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.

SEIFERT, H. et al. Distribution of *Acinetobacter* Species on Human Skin: Comparison of Phenotypic and Genotypic Identification Methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 11, p. 2819-2825, 1997.

SMOLYAKOV, R. et al. Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. **J. Hosp. Infet.**, v. 54, p. 32-38, 2003.

TIMSIT, J. F. et al. The Digestive Tract Is a Major Site for *Acinetobacter baumannii* Colonization in Intensive Care Unit Patients. **J. Infect. Dis.**, v. 168, n. 11, p. 1336-1337, 1993.

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.

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.

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. 1268-1274, 2003.

VANEECHOUTTE, M. et al. Oildegrading *Acinetobacter* strain RAG-1 and strains described as '*Acinetobacter venetianus* sp nov.' belong to the same genomic species. **Res Microbiol.**, v. 150, p. 69-73, 1999.

VILLERS, D. et al. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* Infections: Microbiological and Clinical Epidemiology. **Ann. Intern. Med.**, v. 129, n. 3, p. 182-189, 1998.

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 a.

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 b.

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

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 **J. Antimicrob. Chemother.**, in press, 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.

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.3.18.2.1-3.18.2.21, 2004.

ZARRILLI, R. et al. Molecular Epidemiology of Sequential Outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit Shows the Emergence of Carbapenem Resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 3, p. 946-953, 2004.

APÊNDICE - FÓRMULAS DE MEIOS E INTERPRETAÇÃO DAS PROVAS PARA
IDENTIFICAÇÃO DE *Acinetobacter baumannii*

1. TESTE DA CATALASE

1.1. Procedimento:

Método da Lâmina:

- a) Com o auxílio de uma agulha o centro de uma colônia pura (depois de 24h de incubação) foi tocado e colocado em uma lâmina limpa;
- b) O teste não pode ser aplicado se o ágar sangue for inoculado na H₂O₂;
- c) Uma gota de 30% de H₂O₂ foi colocada na colônia que estava sob a lâmina;

Obs.: Não pode ser revertida a ordem do procedimento pois falso positivo pode ocorrer;

Obs.: Não precisa misturar a cultura e a H₂O₂.

- d) Foi observado o imediato borbulhamento (liberação de gás) e reportado o resultado;
- e) A lâmina foi descartada em um desinfectante.

1.2. Interpretação:

- Positivo (+): imediato borbulhamento de fácil observação, formando O₂.
- Negativo (-): não borbulhamento, não forma O₂.

1.3. Controle de Qualidade:

- Controle positivo: *S. aureus* família *Micrococcaceae*
- Controle negativo: *E. faecalis* ou *Streptococcus* spp família *Streptococcaceae*

2. REDUÇÃO DE NITRATO

2.1. Composição do Meio:

- Extrato de carne 3,0g
- Peptona 5,0g

- Nitrato de potássio, KNO_3 , 0,1% 1,0g
- Água deionizada q.s.p. 1000mL
- pH do caldo nitrato 7,0

2.2. Procedimento:

As linhagens, após serem cultivadas em ágar simples, foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo 5,0 mL de meio e incubadas a 37°C por 48h.

2.3. Interpretação:

As leituras foram realizadas após adição de 5 gotas de ácido sulfanílico e 5 gotas de alfa-naftilamina a cada tubo teste em seguida o material foi agitado vagarosamente para misturar os reagentes.

- Primeira etapa: as reações foram interpretadas quanto à mudança de cor e produção de gás, a saber:

1 – desenvolvimento de cor vermelha e produção de bolhas no tubo de Durham: prova positiva para nitrato e gás;

2 – desenvolvimento de cor vermelha e sem produção de bolhas no tubo de Durham: prova positiva para nitrato e negativa para gás,

3 – sem alteração de cor e produção de bolhas no tubo de Durham: prova positiva para nitrato e gás;

4 – sem alteração de cor no meio e sem produção de bolhas: partir para a segunda etapa.

- Segunda etapa: uma pitada (aprox. 20mg) de zinco em pó foi adicionado.

Aguardou-se de 5 a 10 minutos para a leitura:

1 – ausência de desenvolvimento de cor pela ausência de nitrato no meio, pois este já havia sido reduzido a outros produtos diferentes de nitrito, como amônia, nitrogênio molecular (desnitrificação), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) e hidroxilamina. O teste foi considerado positivo para redução do nitrato.

2 – desenvolvimento de cor vermelha: os íons zinco reduzem os nitratos a nitritos, com o desenvolvimento de cor vermelha, indicando a presença de nitratos que não haviam sido reduzidos na primeira etapa, confirmando que a reação foi realmente negativa.

2.4. Controle de Qualidade (MO):

- *Escherichia coli* ATCC 25922, nitrato positivo, gás negativo
- *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, nitrato negativo

3.PROVA DE CITRATO (SIMMONS)

3.1. Composição do Meio:

- | | |
|-----------------------------|-----------|
| ▪ Fosfato diácido de amônio | 1,0g |
| ▪ Fosfato dipotássico | 1,0g |
| ▪ Cloreto de sódio | 5,0g |
| ▪ Citrato de sódio | 2,0 |
| ▪ Sulfato de magnésio | 0,20g |
| ▪ Ágar | 15,0g |
| ▪ Azul-de-bromotimol | 0,08g |
| ▪ Água destilada q.s.p. | 1000,0 ml |
| ▪ pH 6,9 ± 0,2 | |

3.2. Procedimento:

Uma colônia isolada foi colhida de um meio isolamento primário e semeada em forma de estria única na superfície inclinada do ágar citrato, e o material incubado a 35 °C por 24 a 48 horas.

3.3. Interpretação:

A prova positiva foi representada pelo desenvolvimento de cor azul-escura dentro de 24 a 48 h, indicando que o MO em estudo foi capaz de utilizar o citrato contido no meio, com formação de produtos alcalinos. A prova também seria positiva na ausência de cor azul, se houvesse crescimento visível de colônias ao longo da estria de inoculação. Isto foi válido porque, para que o crescimento fosse visível, o MO deveria estar na fase log de crescimento, caso em que a assimilação de carbono e nitrogênio ocorreu. A interpretação positiva, baseada na leitura da estria, pode ser confirmada mediante incubação do tubo por mais 24 h, quando, em geral, desenvolve-se uma cor azul.

3.4. Controle de Qualidade (MO):

- Controle positivo: *Enterobacter aerogenes*
- Controle negativo: *E. coli*

4. HIDRÓLISE DA ESCULINA

4.1. Composição do Meio (Ágar Esculina Modificado):

- | | |
|---------------------------|-----------|
| ▪ Esculina | 1,0g |
| ▪ Citrato férrico | 0,5g |
| ▪ Ágar infusão de coração | 40,0g |
| ▪ Água destilada q.s.p. | 1000,0 ml |

4.2. Procedimento:

Utilizando alça bacteriológica ou vareta de madeira, o centro de uma colônia isolada foi tocado e a superfície de um ágar inclinado ou caldo foi semeada. Foi incubado durante 18 a 24 h a 35°C.

4.3. Interpretação:

O desenvolvimento de cor negra ou ausência de fluorescência sob luz ultravioleta (360) foi interpretado como resultado positivo. A presença de fluorescência ou a ausência de cor negra indicou resultado negativo.

4.4. Controle de Qualidade (MO):

- Controle positivo: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7965
- Controle negativo: *P. aeruginosa* ATCC 19615

5. LIQUEFAÇÃO DA GELATINA

5.1. Composição do Meio (Meio de gelatina Nutritiva):

- | | |
|--------------------------------------|-----------|
| ▪ Extrato de carne, ou caldo infusão | 3,0g |
| ▪ Peptona | 5,0g |
| ▪ Gelatina, 12% | 120,0g |
| ▪ Água deionizada | 1000,0 ml |
| ▪ pH 6,8 ±7,0 | |

5.2. Procedimento:

O meio de gelatina foi retirado do refrigerador no momento do uso e em seguida um inóculo abundante foi semeado até a profundidade de 2 a 2,5 cm.

Em paralelo um tubo com o meio sem inóculo foi semeado para controle e o material incubado a 36,5°C por 24 horas a 14 dias.

5.3. Interpretação:

O crescimento foi controlado diariamente durante duas semanas. A cada 24 horas ambos os tubos foram colocados no refrigerador por aproximadamente 2

horas e inclinados para a verificação da liquefação e ambos os tubos foram comparados.

5.4. Controle de Qualidade (MO):

- Controle positivo: crescimento e liquefação
 - *P. vulgaris* ATCC 8427
 - *Serratia proteamaculans* ATCC 19323
- Controle negativo: crescimento e não liquefação
 - *E. coli* ATCC 25922

6. Testes de Descarboxilase (LISINA, ORNITINA) e de Dehidrolase (ARGININA)

6.1. Composição do Meio (Base de descarboxilase de Moeller):

Ingredientes:

- | | |
|-----------------------------|-----------|
| ▪ Peptona (pepsin) | 5,0 g |
| ▪ Extrato de carne | 5,0 g |
| ▪ Púrpura de bromocresol | 0,1 g |
| ▪ Cresol vermelho | 0,005 g |
| ▪ Piridoxal fosfato | 0,005g |
| ▪ Glicose (dextrose) | 0,5g |
| ▪ Água deionizada | 1000,0 ml |
| ▪ pH do meio: $6,0 \pm 0,2$ | |

Indicador de pH:

- Púrpura de bromocresol: ácido: amarelo, pH 5,2; alcalino: púrpura, pH 6,8.
- Cresol vermelho (alcalino): alcalino: amarelo, pH 7,2; alcalino: vermelho, pH 8,3.
- Meio sem inóculo: pH 6,0, púrpura brilhante.

6.2. Procedimento:

Um inóculo pesado de uma colônia pura foi preparado. Um tubo controle sem aminoácido foi inoculado com cada bateria de aminoácidos sob investigação. Os tubos foram vedados com parafina ou óleo mineral esterilizados (\pm 4 ml). Sob estas condições o oxigênio do meio foi consumido pelo microrganismo, o que controla o pH e incubado a 35 °C, 24 hs-4 dias. Incubação prolongada de 6 a 10 dias para demonstração de reações fracas diante de atividade pobre de descarboxilase.

6.3. Interpretação:

- Positivo: púrpura turvo a tons de púrpura amarela apagada;
- Negativo: cor amarelo claro e brilhante (somente fermentação da glicose)

6.4. Controle de Qualidade (MO):

- Controle positivo: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047
- Controle negativo: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 10031

7. TESTE DO MALONATO

7.1. Composição do Meio:

Ingredientes:

- | | |
|---|--------|
| ▪ Extrato de levedura | 1,0g |
| ▪ Sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2,0g |
| ▪ Fosfato dipotássio K ₂ HPO ₄ | 0,6g |
| ▪ Fosfato monopotássio KH ₂ PO ₄ | 0,4g |
| ▪ Cloreto de sódio NaCl | 2,0g |
| ▪ Malonato de sódio | 3,0g |
| ▪ Glicose (dextrose) | 0,25g |
| ▪ Azul de bromotimol (BTB) | 0,025g |

- Água deionizada 1000 ml

Indicador de pH: azul de bromotimol (BTB)

- Ácido: amarelo, pH 6,0
- Alcalino: azul da Prússia, pH 7,6
- Meio sem inóculo: pH 6,7, verde

7.2. Procedimento:

Um inóculo fraco de uma colônia pura foi preparado e incubado a 35 °C, 24-48 h.

7.3. Interpretação:

- Positivo: reação alcalina, de azul claro a azul da Prússia através do meio.
- Negativo: sem mudança de cor (verde) ou amarelo (apenas fermentação da glicose).

7.4. Controle de Qualidade (MO):

- Controle positivo: *E. aerogenes* ATCC 13048; *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883
- Controle negativo: *E. coli* ATCC 25922

8. TESTE DE MOTILIDADE

8.1. Composição do Meio:

Ingredientes

- Extrato de carne 3,0g
- Cloreto de sódio 10,0g
- Ágar 4,0g
- Água destilada 1000 ml

- pH 7,3

8.2. Procedimento:

A partir de uma colônia pura foi realizado um stab no centro do tubo com profundidade do stab até metade do tubo. Em seguida foi realizada a incubação a 35°C, 24-48 h. Os casos negativos, foram incubados a 21-25 °C por 5 dias.

8.3. Interpretação:

- Positivo: bactérias móveis migraram a partir do stab, deixando o meio turvo.
- Negativo: bactéria cresce apenas na linha do stab, o meio continuou límpido.

8.4. Controle de Qualidade (MO):

- Controle positivo: *E. coli* ATCC 25922; *Clostridium sporogenes* ATCC 11437
- Controle negativo: *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923

9. TESTE DE OXIDAÇÃO - FERMENTAÇÃO

9.1. Composição do Meio (Meio basal OF de Hugh e Leifson):

Ingredientes do meio semi-sólido, pH 7,1:

- | | |
|---|------------|
| ▪ Peptona caseína (triptona) 0,2% | 2,0g |
| ▪ Cloreto de sódio NaCl | 5,0g |
| ▪ Fosfato dipotássio (K ₂ HPO ₄) | 0,3g |
| ▪ Ágar | 2,0 – 3,0g |
| ▪ Azul de bromotimol (BTB) | 0,03-0,08g |
| ▪ Água deionizada | 1000 ml |

Indicador de pH: azul de bromotimol (BTB):

- Ácido: amarelo, pH 6,0
- Alcalino: azul da Prússia, pH 7,6

- Meio sem inóculo: verde, pH 7,1

9.2. Procedimento:

Dois tubos foram inoculados para cada carboidrato, sendo um deles selado (1,0-2,0 ml) com vaselina ou óleo mineral estéril. Controles: um tubo sem inóculo e sem carboidrato e um sem inóculo, com carboidrato. Incubou-se a 35 °C por 48 h ou mais. Bactérias de crescimento lento podem requerer 3-4 dias, ou até 14 dias.

9.3. Interpretação:

- **Oxidação:** tubo aberto: amarelo; tubo selado: verde.
- **Fermentação:** tubos aberto e selado: amarelo.
- **Inalterado:** Nenhum tubo com reação. Aberto: azul ou verde; fechado: púrpura.

9.4. Controle de Qualidade (MO):

- Fermentador: *E. coli* ATCC 25922 ou *K. pneumoniae* ATCC 13883
- Oxidativo: *P. aeruginosa* ATCC 27853
- Inerte: *Moraxella* spp ou *Moraxella osloensis* ATCC 10973

10. TESTE DA FENILALANINA DESAMINASE

10.1. Meio (Meio Fenilalanina):

- | | |
|--|---------|
| ▪ DL-fenilalanina | 2,0g |
| ▪ Extrato de levedura | 3,0 g |
| ▪ Cloreto de sódio | 5,0g |
| ▪ Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄) | 1,0 g |
| ▪ Ágar | 12,0g |
| ▪ Água deionizada | 1000 ml |

OBS: Se for usada L-fenilalanina pesar apenas 1,0g.

10.2. Procedimento:

Um inóculo pesado de cultura pura foi feito e passado na superfície inclinada do tubo. Foi incubado a 35 °C, 4 h ou 18-24 h.

10.3. Interpretação:

Para leitura da prova pode-se usar dois reagentes:

- FeCl₃ aquoso 10%, adicionou-se 4-5 gotas ao tubo após o período de incubação. A reação positiva ocorreu dentro de 1-5 min. Positivo: verde. Negativo: não altera cor (amarelo).
- Sulfato de amônio férrico: acidificou-se o meio com ácido sulfúrico a 10%, usando fenol vermelho como indicador (alcalino: vermelho, ácido: amarelo). Adicionou-se 4-5 gotas de sulfato de amônio férrico parcialmente saturado. O tubo foi agitado lentamente. A reação ocorreu dentro de 1 min. Positivo: verde. Negativo: cor do reagente inalterada.

10.4. Controle de Qualidade (MO):

- Crescimento negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922
- Crescimento positivo: *P. mirabilis* ATCC 12453 – crescimento positivo

ANEXO - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA