

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**Caracterização de isolados clínicos e ambientais de
Acinetobacter sp.: presença de IS*Aba1* e diversidade
de *bla*_{OXA-51-like}**

CAROLINA DE SOUZA GUSATTI

Biomédica- UFRGS

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**Caracterização de isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter* sp.: presença
de *ISAbal1* e diversidade de *bla*_{OXA-51-like}**

CAROLINA DE SOUZA GUSATTI

Biomédica- UFRGS

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Orientadora: Dra. Gertrudes Corção

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Abril de 2011

CIP - Catalogação na Publicação

Gusatti, Carolina de Souza
Caracterização de isolados clínicos e ambientais de
Acinetobacter sp.: presença de ISAbA 1 e diversidade
de blaOXA-51-like. / Carolina de Souza Gusatti. --
2011.

94 f.

Orientador: Gertrudes Corção.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Acinetobacter sp.. 2. Isolados Clínicos. 3.
Isolados Ambientais. 4. ISAbA 1. 5. blaOXA-51-like.
I. Corção, Gertrudes, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DAS UTOPIAS

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos se não fora

A mágica presença das estrelas!

Mário Quintana

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a professora Dra. Gertrudes Corção, pelo exemplo de profissionalismo, competência e dedicação dispensados durante a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório, Ester Souza Lopes, Letícia Muner Otton, Natália Canal, Giuliano Robertson Hickembick, Waldir Emílio Henkes, Alessandra Einsfeld Ferreira e Desirèe Padilha Marchetti pelas discussões que nortearam o desenvolvimento desse estudo.

A minha querida estagiária Lauren Martins Bertholdo, pela disposição em aprender e me ajudar sempre que necessário.

Aos professores do PPGMAA, fundamentais colaboradores para a formação científica, profissional e pessoal.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, por proporcionar aos seus alunos formação de excelência.

A Dra. Ana Gales e ao Danilo Elias Xavier, pela concessão dos isolados utilizados como controles positivos dos genes analisados durante este estudo.

Aos colegas de curso e amigos, pelas longas discussões acadêmicas que tanto auxiliaram em minha formação e pelos momentos de companheirismo e amizade nas horas de lazer.

A toda a minha família, em especial minha mãe, Sônia, e minha irmã, Letícia, por todo o amor, carinho, dedicação, incentivo e por nunca deixarem de acreditar em mim.

A meu pai, Flávio, por sempre estar presente em meus pensamentos.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Caracterização de isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter* sp.:
presença de *ISAbal* e diversidade de *bla*_{OXA-51-like}¹

Resumo

Autora: Carolina de Souza Gusatti

Orientadora: Dra. Gertrudes Corção

A capacidade de adquirir, com facilidade, resistência à terapia antimicrobiana torna-se uma das características mais estudadas em *Acinetobacter* sp., mundialmente conhecido por estar relacionado a surtos de infecções associadas à assistência a saúde (IAAS) e por ser apontado como um grave problema de saúde pública. Embora isolados clínicos desse gênero sejam extensivamente estudados quanto à presença e a diversidade de genes do tipo OXA-carbapenemases, existem poucos estudos sobre essa relação em isolados ambientais. Este trabalho teve como objetivo determinar a presença de carbapenemases do tipo OXA (e sua diversidade), de *ISAbal* e de sua relação com as carbapenemases em isolados clínicos e de esgoto hospitalar de *Acinetobacter* sp. na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Um total de 310 isolados (145 clínicos e 165 ambientais) foram submetidos a análise por PCR das regiões genéticas de interesse. A diversidade dos genes do tipo *bla*_{OXA-51} foi realizada por DGGE. Os resultados indicam a presença do gene *bla*_{OXA-58} em um isolado, pela primeira vez no Brasil. A sequência *ISAbal* foi frequentemente encontrada (92,9%), porém, a sua associação com *bla*_{OXA-51} foi baixa e encontrada em 9,8% dos isolados clínicos e em 6,5% dos isolados ambientais. A análise de diversidade revelou uma baixa frequência de alelos de OXA-51 entre os isolados estudados, sendo *bla*_{OXA-65} a variante mais encontrada. Contudo, podemos afirmar que o esgoto hospitalar analisado constitui-se de uma fonte de contaminação de bactérias patogênicas e que as precárias políticas de saneamento podem proporcionar a disseminação de multirresistência para o meio ambiente.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Molecular de Procariotos e Eucariotos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (94p), Abril, 2011.

Characterization of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter* sp.:
IS*Aba1* presence and diversity of *bla*_{OXA-51-like}¹

Abstract

Author: Carolina de Souza Gusatti

Advise: Dr. Gertrudes Corção

The ability of easily acquiring resistance to antimicrobial therapy becomes one of the most studied features in *Acinetobacter* sp., world renowned for being related to outbreaks of infection associated with health care and for being appointed as a serious public health problem. Although clinical isolates of this genus are extensively studied for the presence and diversity of OXA-carbapenemase genes, there are few studies about this relationship in environmental isolates. This study aimed to determine the presence of OXA-type carbapenemases (and yours diversity), of IS*Aba1* and its relationship with carbapenemases in clinical and hospital sewage isolates of *Acinetobacter* sp. in Porto Alegre, Rio Grande do Sul. A total of 310 strains (145 of clinical origin and 165 of environmental origin) were subjected to PCR analysis of genetic regions of interest. The diversity of *bla*_{OXA-51-like} genes was performed by DGGE. The results indicate the presence of the gene *bla*_{OXA-58} in an isolated, for the first time in Brazil. IS*Aba1* was frequently found (92.9%) but its association with *bla*_{OXA-51-like} was low and was found in 9.8% of clinical isolates and in 6.5% of environmental isolates. The diversity analysis showed that there is a low frequency of alleles of OXA-51 among the studied isolates being *bla*_{OXA-65} variant the most often found. However, we can state that the hospital sewage is considered to be a source of pathogenic bacteria contamination and that the poor sanitation politics contributes to the spread of multidrug resistance in the environment.

¹Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Molecular Microbiology of Prokaryotes and Eukaryotes, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (94p), April, 2011.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	x
RELAÇÃO DE FIGURAS	xi
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 O gênero <i>Acinetobacter</i>	4
2.2 Multirresistência em <i>Acinetobacter</i> sp.....	8
2.3 Resistência aos Carbapenêmicos	12
2.3.1 O gene <i>bla</i> _{OXA}	13
2.4 Sequências de Inserção <i>ISAb_a</i>	18
2.5 Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE).....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Isolados Bacterianos	22
3.2 Extração de DNA Bacteriano	23
3.3 Pesquisa dos genes <i>bla</i> _{OXA-24} , <i>bla</i> _{OXA-58} , da Sequência de Inserção <i>ISAb_a1</i> e da associação de <i>ISAb_a1</i> com os genes <i>bla</i> _{OXA}	24
3.4 DGGE- Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação	27
3.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	29
3.6 Sequenciamento dos genes <i>bla</i> _{OXA-58} e dos fragmentos obtidos pelo DGGE.....	30
3.7 Análise de dados.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Amplificação dos genes <i>bla</i> _{OXA-24-like} e <i>bla</i> _{OXA-58-like}	32
4.2 Pesquisa de <i>ISAb_a1</i> e de sua relação com <i>bla</i> _{OXA-51-like}	37
4.3 Diversidade dos genes <i>bla</i> _{OXA-51-like}	44
5. CONCLUSÕES.....	52

6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
9.	ANEXOS.....	65
9.1	Anexo 1: Relação de reagentes e soluções utilizadas	65
9.2	Anexo 2: Alinhamento de alelos do tipo <i>bla</i> _{OXA-51-like} utilizados para na Técnica de DGGE.....	71

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Diferenciação fenotípica das espécies genômicas do complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *A. baumannii*.

Tabela 2: Métodos usuais de controle e prevenção de infecções causadas por *Acinetobacter* sp.

Tabela 3: Subgrupos de carbapenemases da família OXA de β -Lactamases.

Tabela 4: Listagem de oligonucleotídeos utilizados para a realização de PCR e de PCR para técnica de DGGE.

Tabela 5: Perfil de susceptibilidade encontrado em associação com perfil genético de isolados clínicos de *Acinetobacter* sp.

Tabela 6: Perfil de susceptibilidade encontrado em associação com perfil genético de isolados de efluente hospitalar de *Acinetobacter* sp.

Tabela 7: Perfil de identidade genética à família OXA-51 encontrada em isolados de *Acinetobacter baumannii* selecionados por DGGE.

Tabela 8: Soluções de uso para os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo.

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Eletroforese realizada para os fragmentos amplificados do isolado positivo para *bla*_{OXA-58} e suas relações com *ISAbal1*.

Figura 2: Alinhamento das proteínas traduzidas pelos genes *bla*_{OXA-66}, *bla*_{OXA-65} e *bla*_{OXA-69}, intimamente relacionados.

Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de desnaturação (DGGE) variando de 30 a 60%.

Figura 4: Relação filogenética construída através de alinhamento das sequências dos genes *bla*_{OXA-51-like} analisados.

Figura 5: Alinhamento de 29 alelos pertencentes ao grupo OXA-51 utilizados para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores da técnica de DGGE.

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - porcentual

≤ – menor ou igual

≥ – maior ou igual

°C – grau Celsius

µg – microgramas

µL – microlitro

µM – Micromolar

A – adenina

AMI – amicacina

AMS – ampicilina/sulbactam

ARI-1 – (*Acinetobacter* resistente a imipenem -1), enzima β-lactamase

ATM – aztreonam

BHI – infusão cérebro-coração (do inglês- Brain-Heart Infusion)

C – citosina

CAZ – ceftazidima

CG – conteúdo de citosinas e guaninas

CHDLs – oxacilinases hidrolisantes de carbapenêmicos

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIP – ciprofloxacina

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CPM – cefepime

D – aspartato

DGGE – Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação

DNA – Ácido desoxiribonucléico

dNTPs – desoxirribonucleotídeos fosfatados

E – ácido glutâmico

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EPI – equipamento de proteção individual

ERIC – enterobacterial repetitive intragenic consensus

ESBL – beta lactamase de espectro estendido

et al., - e colaboradores

g – gramas

G – guanina

GEN – gentamicina

H – histidina

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HSL (PUCRS) – Hospital São Lucas (Pontifícia Universidade Católica- Rio Grande do Sul)

IAAS – Infecção associada à assistência a saúde

IPM – Imipenem

IS – Sequência de Inserção

IS*Aba* – Sequência de Inserção *Acinetobacter baumannii*

K – lisina

L – litro

M – molar

MBL – Metalo-beta-lactamase

MEM – meropenem

mg – miligramas

MgCl₂ – cloreto de magnésio

mL – mililitros

N – asparagina

NaCl – Cloreto de sódio

ORF – open reading frame (fase aberta de leitura)

OXA – Oxacilinase

pb – pares de bases

PBPs – proteínas ligadoras de penicilinas

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFGE – Pulsed Field Gel Eletroforesis (gel de eletroforese em campo pulsado)

pH – logaritmo decimal do inverso da atividade de íons de hidrogênio em solução

Q – glutamina

RNA – Ácido ribonucléico

SDS – dodecil sulfato de sódio

SUT – trimetropim/sulfametoxazol

T – timina

TAE – Solução Tris- acetato- EDTA

TE – solução Tris- EDTA

TEMED – N,N,N',N'- Tetrametiletilenodiamino

TES – Tris- EDTA-NaCl

TIC – ticarcilina/ácido clavulânico

TZP – piperacilina/tazobactam

U – unidade

UPGMA – Unweighted Pair-Group Method with Average Linkages

UV – luz ultravioleta

V – valina

V – volts

β -Lactamases – beta-lactamase

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* está amplamente distribuído na natureza, principalmente em ambientes aquáticos, apresentando-se sob a forma de cocobacilos Gram-negativos, não fermentadores de glicose. Por sua capacidade de resistir ao dessecamento e a condições adversas, normalmente habita a pele humana e trato respiratório superior, constituindo parte da microbiota normal humana. Atualmente, existem mais de trinta espécies já identificadas, sendo que o complexo *A. baumannii* - *A. calcoaceticus* está entre as espécies bacterianas clinicamente relevantes, estando muitas vezes relacionados à casos de infecção associada à assistência a saúde (IAAS). Essas infecções, geralmente oportunistas, quando acometidas em pacientes imunocomprometidos, tendem a ser graves, pois o micro-organismo adquire facilmente resistência ao tratamento com antibióticos.

Nos últimos anos, o gênero *Acinetobacter* vem se destacando por apresentar, com muita facilidade, resistência a diversos antibióticos, entre eles aos β -lactâmicos, utilizados como principal terapia em infecções bacterianas desse tipo. Tal gênero, por estar presente nos mais diversificados ambientes, é capaz de albergar genes que causam resistência e disseminá-los através de elementos móveis presentes em seu genoma. Para tanto, o conhecimento desses genes é de fundamental importância, pois estão envolvidos no mecanismo de ação de enzimas β -lactamases.

Entre as enzimas que hidrolisam os carbapenêmicos em *Acinetobacter* sp., as oxacilinasas (pertencentes a classe D de Ambler) são as mais importantes e estão distribuídas em quatro subgrupos filogenéticos principais: tipo OXA – 23, tipo OXA – 24/40; tipo OXA – 51 e tipo OXA – 58. O subgrupo OXA – 51 está relacionado com a espécie *Acinetobacter baumannii*, sugerindo que a identificação através desse gene poderia ser uma maneira de identificação da espécie.

O subgrupo OXA-51 é conhecido por só expressar resistência aos carbapenêmicos quando possui associação direta com sequências de inserção do tipo IS*Aba* (as já relatadas para a este grupo foram IS*Aba1* e IS*Aba9*). Essas sequências são conhecidas por serem os menores e mais abundantes elementos genéticos capazes de realizar transposição e possuem, em seu conteúdo, sequências de DNA que atuam como promotores genéticos, aumentando desta maneira, a expressão da proteína a que estão associados.

Devido à grande diversidade dos genes *bla*_{OXA}, existe uma dificuldade em determinar com exatidão qual gene a bactéria apresenta. Para tanto, técnicas de biologia molecular tendem a ser uma valiosa ferramenta. O desenvolvimento de técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com o uso de oligonucleotídeos iniciadores para grupos afins representa um grande avanço no estudo de diversidade genética. Além disso, análises por DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação) constituem uma ferramenta simples, porém poderosa para detecção de mutações ao longo da fita de DNA, utilizada para identificação de variantes genéticas.

Para tanto, o presente estudo teve por objetivo fazer uma análise da presença de carbapenemases do tipo OXA (OXA-24 e OXA-58) e da presença de *ISAbal1* bem como sua associação com *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-58} na tentativa de justificar a multirresistência dos isolados analisados. Num segundo momento, procurou-se realizar estudo de diversidade genética do grupo OXA-51 em isolados de *Acinetobacter baumannii*, com finalidade de verificar a frequência dos alelos presentes nos isolados em estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Acinetobacter*

A história taxonômica do gênero *Acinetobacter* é bastante confusa, datando de 1911, quando o cientista alemão Beijerinck descobriu uma nova espécie isolada de solo e nomeou-a *Micrococcus calcoaceticus*. Entretanto, conforme os anos se passaram, novos micro-organismos, com características similares foram descobertos e então, classificados em pelo menos 15 espécies e gêneros diferentes, entre eles *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Moraxella lwoffii* var. *glucidolytica*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratum* e *Achromobacter mucosus* (Peleg *et al.*, 2008).

Porém, em 1954, com o intuito de distinguir as cepas móveis de não móveis, o gênero foi reclassificado por Brisou e Prévot e nomeado como *Acinetobacter* (do grego *akinetos*: não móvel). Consistem em bactérias saprofíticas Gram-negativas, estritamente aeróbias, não móveis, catalase positiva e oxidase negativa, com 39-47% moles de conteúdo de GC em seu DNA (Bergogne-Berezin e Towner 1996). Durante a fase exponencial, apresentam-se sob forma de bacilos, ocorrendo aos pares e em alguns casos, em cadeias. Quando entram na fase estacionária, diminuem e assumem a forma cocóide podendo permanecer singulares ou agrupando-se aos pares; em

algumas cepas, as células podem ser encapsuladas. Não são capazes de produzir esporos nem pigmentos, e não fixam o nitrogênio. Crescem em meio mineral com acetato como única fonte de carbono e utilizam amônia ou nitrato como fonte de nitrogênio. Algumas cepas podem utilizar uma ampla variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono, entre eles, hidrocarbonetos, ácidos alifáticos, açúcares pentoses, alcoóis, aminoácidos e componentes aromáticos. São incapazes de utilizar metanol, glicerol, alcoóis poli-hídricos, dissacarídeos e polissacarídeos. Com raras exceções, são incapazes de crescer em ambientes com D-glicose ou gluconato como fonte de carbono. A maioria das cepas sintetiza lipase e poucas são capazes de produzir gelatinase (Baumann *et al.*, 1968).

O gênero foi inicialmente encaixado na família *Neisseriaceae*, mas estudos de hibridização DNA-rRNA e análises filogenéticas baseadas na amplificação de fragmento do DNA ribossomal 16SrRNA mostraram que o gênero *Acinetobacter*, na realidade, pertencia à subclasse γ da Classe *Proteobacteria*. O gênero foi, então, re-alojado dentro da família *Moraxellaceae* (Janssen *et al.*, 1997). Atualmente existem, pelo menos, 33 espécies e destas, 17 já foram nomeadas; as espécies remanescentes (genômicas) são designadas por números. Esta classificação é derivada de estudos feitos por Bouvet e Jeanjean (1989) e Tjernberg e Ursing (1989). Espécies como *Acinetobacter marinus*, *Acinetobacter seohaensis*, *Acinetobacter rhizosphaerae* e *Acinetobacter venetianus* permanecem sob revisão (Hanlon, 2005). Recentemente, 10 espécies adicionais foram identificadas, sendo três de origem clínica, *A. parvus*, *A. schindleri* e *A. ursingii*, e sete isoladas em vegetais

existentes em sistemas de lodo ativado, *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. towneri*, *A. tandoii* e *A. gernerii* (Peleg *et al.*, 2008).

A identificação fenotípica pelos métodos bioquímicos usuais encontra dificuldade em diferenciar as quatro espécies do complexo *A. baumannii*- *A. calcoaceticus* (*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus* e as duas espécies genômicas não nominadas: 3 e 13UT) (Tabela 1). Isto se deve à similaridade genética e fenotípica das espécies. *A. calcoaceticus* é considerado um organismo do solo, enquanto as outras três são as espécies clinicamente mais importantes do gênero, sendo que *Acinetobacter baumannii* aparentemente é mais prevalente em infecções e epidemias (Chang *et al.*, 2005). Métodos mais apurados e eficientes para a identificação do gênero utilizam técnicas moleculares como hibridização DNA-DNA, ribotipagem, amplificação de 16S rDNA e análise por eletroforese de campo pulsado (Carr, 2003).

Acinetobacter sp. tem características ubiquitárias e pode ser isolada do solo e da água, onde são amplamente distribuídos (Misbah *et al.*, 2005). Habitam a pele humana e são capazes de colonização transitória do trato respiratório superior, entretanto não são considerados agentes patogênicos em pessoas saudáveis. Em contrapartida, são considerados patógenos oportunistas importantes, causadores de infecções nosocomiais (Janssen *et al.*, 1997). Nos últimos anos tem sido isolado com mais freqüência no ambiente hospitalar onde pode causar sérias infecções, principalmente em pacientes debilitados e internados das Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (Higgins *et al.*, 2010). Os principais sítios de infecção são o trato respiratório, o trato

urinário, a corrente sanguínea, ferimentos e queimaduras (Karlowsky *et al.*, 2003).

Tabela 1: Diferenciação fenotípica das espécies genômicas do complexo *Acinetobacter calcoaceticus* -*A. baumannii*.

Características	Espécies genômicas			
	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i>	3	3UT
Crescimento a 41 °C	[-]	+	V	+
Crescimento a 44°C	-	+	-	V
Crescimento em:				
L-Arabinose	V	[+]	V	+
D-Glucorato	V	[+]	[+]	[-]
D-ribose	V	[+]	V	[+]
Ácido Sórbico	[-]	V	[-]	[+]
Glicerato	[+]	[-]	V	[-]
Levulinato	V	V	-	[-]
L-Tartarato	[-]	V	[+]	[-]
Acetil-L-Glutamina	[-]	V	V	V
D- Asparagina	+	-	-	[-]
L-Hidroxi prolina	[-]	[+]	[-]	V

Adaptado de Garrity *et al.*, 2005.

Símbolos: + = todas as cepas positivas; [+]= 80% ou mais positivas; V= 20-79% positivas; [-]= 20% ou menos negativas; - =todas as cepas negativas

A habilidade de sobreviver em superfícies secas e resistir ao dessecação torna as cepas de *Acinetobacter baumannii* capazes de permanecer na pele dos pacientes, médicos e enfermeiros por períodos prolongados, tornando-se potenciais causadores de surtos de infecção

hospitalar. Além da pele, a transmissão pelos ductos de ar condicionado também tem sido observada, o que contribui para a contaminação dos equipamentos médicos e transmissão para os pacientes (Jawad *et al.*, 1998). A persistência desta espécie também ocorre pela capacidade de crescer em uma faixa ampla de temperatura e pH, o que favorece a permanência em ambientes hospitalares (Abbo *et al.*, 2005).

Os surtos de infecções associadas à assistência a saúde (IAAS) causadas por *Acinetobacter* sp. podem ser controlados reforçando a higiene das mãos, limpeza dos pisos e paredes, bem como a esterilização dos equipamentos, leitos, roupas e equipamentos de ventilação (Tabela 2) (Coelho *et al.*, 2004).

2.2 Multirresistência em *Acinetobacter* sp.

As infecções por *Acinetobacter* sp. tornam-se cada vez mais graves à medida que as bactérias apresentam resistência aos antimicrobianos do tratamento a que são submetidas. Desde o início de 1970, isolados de *Acinetobacter* sp. (principalmente *Acinetobacter baumannii*) tem progressivamente acumulado resistência sucessiva às penicilinas, cefalosporinas, quinolonas e aminoglicosídeos. Conseqüentemente, o uso de carbapenêmicos tornou-se a terapia de escolha para as infecções sérias causadas pelo gênero (Coelho *et al.*, 2004).

Tabela 2: Métodos usuais de controle e prevenção de infecções causadas por *Acinetobacter* sp.

Método	Comentários
Controle na origem	Efetivo em surtos onde a fonte de infecção é conhecida.
Precauções clássicas	Inclui a higiene das mãos, uso correto de jalecos e EPIs*.
Barreiras de Contato	Uso de equipamentos exclusivos ao paciente, bem como o uso correto de luvas e jalecos próprios ao entrar em unidades de isolamento.
Limpeza do ambiente e desinfecção	Contaminação ambiental disseminada é frequentemente encontrada em surtos epidêmicos, onde reservatórios ambientais facilmente atuam como fonte de infecção.
Agrupamento de pacientes	Agrupar pacientes colonizados e infectados em unidades isoladas.
Agrupamento de profissionais de saúde	Designar grupos específicos de profissionais para tratamento apenas dos pacientes infectados e colonizados.
Fechamento da unidade de tratamento	Requerido em alguns casos de surto apenas para interromper a transmissão e proceder a desinfecção do local.
Administração de Antimicrobianos	Programas de administração criteriosa de antimicrobianos, prevenindo a seleção de cepas clonais resistentes.
Vigilância	Vigilância passiva ou ativa pode identificar novos casos de colonização e infecção para que um rápido controle possa ser implementado.

Adaptado de Maragakis e Perl, 2008.

* EPIs: equipamentos de proteção individual

A resistência a aminoglicosídeos ocorre principalmente pela presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, como acetiltransferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases, que são

expressas por genes presentes em integrons de classe 1, comuns no gênero *Acinetobacter*. Recentemente, metilações no 16s rDNA (metiltransferase *armA*) também tem sido descritas em cepas japonesas, coreanas e americanas (Peleg *et al.*, 2008). Essas enzimas atuam impedindo a ligação do antimicrobiano ao seu sítio alvo, gerando, dessa maneira, os altos níveis de resistência descritos aos aminoglicosídeos clinicamente relevantes como gentamicina, tobramicina e amicacina (Doi e Arakawa, 2007). Já a resistência a quinolonas é dada por modificações em enzimas como DNA girase e topoisomerasas do tipo IV, através de mutações em genes *gyrA* e *parC*, respectivamente, que impedem a ligação dos antimicrobianos a seus sítio alvos, culminando na resistência aos mesmos (Hamouda e Aymes, 2006). Além de mecanismos enzimáticos, estudos tem relacionado a presença de bombas de efluxo com os altos níveis de resistência a esses e outras classes de antimicrobianos, como as tetraciclinas e seus derivados, macrolídeos, polimixinas e trimetropim/sulfametoxazol em *Acinetobacter* sp. (Gordon e Wareham, 2010).

Atualmente, conforme mencionado anteriormente, a principal terapia de escolha para infecções desta natureza é o uso de β -lactâmicos, principalmente os carbapenêmicos, como imipenem e meropenem. Porém, a crescente resistência a esses antibióticos vem dificultando ainda mais o tratamento. Geralmente, essas características de resistência são adquiridas por meio de elementos móveis presentes no genoma bacteriano (transposons e plasmídeos) e, por isso, tendem a se disseminar no ambiente em que se localizam (Looveren *et al.*, 2004).

Acinetobacter é resistente à maioria dos β -lactâmicos, em particular penicilinas e cefalosporinas. Atualmente, a resistência a antibióticos é dada por três mecanismos de resistência: produção de enzimas capazes de hidrolisar antibióticos, redução do acesso ao alvo do antibacteriano e alterações do sítio de ação do antimicrobiano (Maragakis & Perl, 2008).

O principal mecanismo de resistência é a produção de β -lactamases cromossômicas ou plasmidiais, como a expressão de cefalosporinase *AmpC*, β -lactamases de espectro estendido (ESBL), metalo- β -lactamases (MBL) e carbapenemases do tipo OXA (OXA-carbapenemases). Além disso, a baixa permeabilidade da membrana externa, resultado da diminuição do tamanho dos poros da membrana e/ou da produção limitada de porinas. Alterações na afinidade das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs- penicillin-binding proteins) e a superexpressão de sistemas de bombas de efluxo também tem sido identificados como mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, pois limitam a entrada do antimicrobiano e/ou expulsam da célula microbiana (Looveren *et al.*, 2004).

O terceiro mecanismo de resistência, menos freqüente, envolve o aparecimento de mutações pontuais que levam às alterações no sítio ativo do antibiótico ou à perda de função, diminuindo, desse modo, a afinidade do antibiótico ou levando a sua inativação, e conseqüentemente, gerando a resistência bacteriana (Maragakis e Perl, 2008).

Mecanismos combinados de resistência bacteriana são freqüentemente encontrados e identificados como um dos causadores de multirresistência disseminada na espécie. Canais de porinas e proteínas de

membrana externa são os principais elementos responsáveis pelo transporte de substâncias ao interior celular e a resistência a antimicrobianos pode estar relacionada com a perda dessas proteínas através dos canais de porinas para a membrana externa. É provável que juntos, a expressão de β -lactamases, a perda de porinas, bem como a superexpressão de bombas de efluxo sejam responsáveis pelos altos níveis de resistência encontrados em isolados de *Acinetobacter* sp. (Bonomo e Szabo, 2006).

Pela classificação de Ambler (1980), as β -lactamases são divididas em quatro classes distintas, com base na estrutura molecular e de acordo com a sequência de aminoácidos. A classe A pertence ao grupo das penicilinas e carbenicilinas (serino β -lactamases e β -lactamases de espectro estendido-ESBL); a classe B engloba as metalo- β -lactamases (MBL); a classe C é referente às cefalosporinas cromossomais (cefalosporinase *AmpC*) e a classe D, pertencente às oxacilinas, derivadas das serino- β -lactamases. A resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp. pode ser conferida pela classe B de Ambler (metalo- β -lactamases), pela classe D (oxacilinas) ou por mecanismos β -lactamases independentes (Coelho *et al.*, 2004).

2.3 Resistência aos Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos, como imipenem e meropenem, são drogas que possuem um amplo espectro de atividade e resistem à hidrólise da maioria das β -lactamases, incluindo as β lactamases de espectro estendido (ESBL) e as cefalosporinas cromossomais *AmpC* (Paterson e Bonomo, 2005). A resistência aos carbapenêmicos no gênero *Acinetobacter* geralmente é

conferida pela produção de metalo- β -lactamase e/ou pela produção de oxacilinas, sendo as últimas mais frequentes (Qi *et al.*, 2008).

Embora a produção de enzimas hidrolisantes seja a forma mais comum de resistência encontrada, mecanismos alternativos de resistência podem ser encontrados, como a redução da atividade das PBPs, superexpressão de bombas de efluxo, diminuição da permeabilidade da membrana ou mecanismos combinados, como a redução da permeabilidade agindo em conjunto com a expressão de enzimas β -lactamases (Walther-Rasmussen e Hoiby, 2006).

2.3.1 O gene *bla_{OXA}*

As β -lactamases do tipo OXA (nome derivado de hidrolisantes de oxacilina) formam o grupo de maior prevalência de famílias gênicas de β -lactamases codificadas por plasmídeos desde o início dos anos 1980. Inicialmente foram classificadas como serino β -lactamases, porém, por serem capazes de hidrolisar oxacilina e cloxacilina acabaram sendo classificadas em um grupo a parte, a classe molecular D de Ambler ou OXA β -lactamases. São, em geral, fracamente inibidas por ácido clavulânico e EDTA e são conhecidas por sua ampla variabilidade na sequência de aminoácidos (Bush *et al.*, 1995).

As oxacilinas formam um grupo de β -lactamases raro, no que diz respeito às propriedades estruturais e bioquímicas. Essas enzimas geralmente hidrolisam oxacilina com mais eficiência do que benzilpenicilina. Além disso, também hidrolisam amoxicilina, metilicina, cefaloridina, e por extensão, cefalotina. A atividade de carbapenemase parece ser uma propriedade intrínseca de algumas oxacilinas que não são derivadas de mutações de

ponto de enzimas conhecidas. A eficiência hidrolítica de oxacilinasas hidrolisantes de carbapenêmicos (CHDLs) contra os carbapenêmicos é muito baixa. Estudos mostram que CHDLs são satisfatoriamente inibidas por NaCl (Poirel e Nordmann, 2006 [a]).

A primeira β -lactamase do tipo OXA com atividade catalítica sobre os carbapenêmicos foi descrita em 1993 em uma cepa de *Acinetobacter baumannii* isolada de um paciente em 1985 na Escócia. Essa enzima apresentava pl de 6,65 e era fracamente inibida por ácido clavulânico e EDTA. Foi primeiramente chamada de ARI-1 e seu seqüenciamento revelou que se tratava de uma enzima do tipo OXA e então passou a ser chamada de OXA-23. A hidrólise de imipenem por essa enzima pode ser detectada em placa, através de ensaio fenotípico apropriado. (Paton *et al.*, 1993).

Oxacilinasas são codificadas por genes da família *bla*_{OXA}. Carbapenemases do tipo OXA tem emergido globalmente como os principais responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* sp. (Carvalho *et al.*, 2009). Recentemente, o número de genes do tipo OXA tem aumentado drasticamente, sendo conhecidos atualmente dez subgrupos diferentes de genes, codificando um grande número de enzimas, sendo que, pelo menos, 40 apresentam atividade de carbapenemases (Tabela 3).

Desses grupos, cinco já foram descritos em isolados de *Acinetobacter* sp. como produtores de carbapenemases: OXA-23, OXA-24 (ou OXA-40), OXA-51, OXA-58 e OXA-143. Estudos mostram uma forte relação entre a presença do gene *bla*_{OXA-51} em isolados de *Acinetobacter baumannii*, sugerindo que este gene poderia atuar como marcador molecular da espécie,

uma vez que este é um gene intrínseco a ela (Turton *et al.*, 2006[b]), tornando a espécie um reservatório desse gene de β -lactamase no ambiente (Feizabadi *et al.*, 2008).

Tabela 3: Subgrupos de carbapenemases da família OXA de β -Lactamases.

Grupo	Subfamília enzimática	Membros OXA adicionais
1	OXA-23 (ARI-1)	OXA-27 e OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133 e OXA-134
2	OXA-24 (OXA-40)	OXA-25, OXA-26, OXA-33 e OXA-72
3	OXA-5 1	OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-67, OXA-68, OXA-69, OXA-70, OXA-71, OXA-75, OXA-76, OXA-77, OXA-78, OXA-79, OXA-80, OXA-82, OXA-83, OXA-84, OXA-86, OXA-87, OXA-88, OXA-89, OXA-90, OXA-91, OXA-92, OXA-93, OXA-94, OXA-95, OXA-104, OXA-106, OXA-107, OXA-108, OXA-109, OXA-110, OXA-111, OXA-112, OXA-113, OXA-115, OXA 116, OXA-117, OXA-130, OXA-131 e OXA-132
4	OXA-58	OXA-96 e OXA-97
5	OXA-55	OXA-SHV
6	OXA-48	OXA-54 e OXA-SAR2
7	OXA-50	OXA-50a, OXA-50b, OXA-50c, OXA-50d e PoxB
8	OXA-60	OXA-60a, OXA-60b, OXA-60c e OXA-60d
9	OXA-62	Nenhum
10	OXA-143	Nenhum

Adaptado de Queenan e Bush, 2007 e Poirel *et al.*, 2010.

O primeiro grupo descrito, OXA-23, inicialmente chamado de ARI-1 (de *Acinetobacter* resistente a imipenem) possui, além da enzima que dá nome ao grupo, mais duas variantes já detectadas na espécie *A. baumannii*, OXA-27 e OXA-49 e diferem em torno de dois a cinco aminoácidos na sua constituição (Qi *et al.*, 2008). este gene foi detectado, pela primeira vez, em um isolado de *A. baumannii*, na Escócia, em 1985, e após estudos, confirmou-se a sua capacidade de transferência genética para outras espécies como *A. junii*. (Scaife *et al.*, 1995). Dados recentes indicam que esta enzima está amplamente distribuída pelo mundo e tem sido relacionada com surtos de infecções associadas à assistência a saúde (IAAS) (Poirel *et al.*, 2010).

Recentemente, variantes do gene *bla*_{OXA-23} (nomeadas, OXA-102, OXA-103 e OXA-105), foram encontradas no cromossomo de espécies não patogênicas e ambientais como *Acinetobacter radioresistens*. Essas enzimas, naturalmente encontradas, quando comparadas à OXA-23, possuem até seis variações de aminoácidos na constituição e níveis similares de resistência aos carbapenêmicos, indicando que espécies não patogênicas podem estar atuando como reservatórios desses genes de resistência no ambiente (Poirel *et al.*, 2010).

O segundo grupo alberga, além da OXA-24 (também chamado de OXA-40), as variantes OXA-25, OXA-26, OXA-33 e OXA-72, que diferem de um a cinco aminoácidos e apresentam em torno de 60% de homologia com o primeiro grupo (o grupo OXA-23) (Wang *et al.*, 2007). A enzima OXA-24/OXA-40 foi primeiramente detectada no cromossomo de um isolado de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos, de origem espanhola. Porém, esta enzima pode ser

encontrada tanto no cromossomo, quanto no plasmídeo, inclusive em espécies bacterianas diferentes, como *Pseudomonas aeruginosa*. Este subgrupo de enzimas está distribuído em diferentes partes do mundo, como Europa, Estados Unidos e Ásia, o que indica sua crescente disseminação mundial (Poirel *et al.*, 2010).

O terceiro grupo constitui a família OXA-51, que conta com mais de quarenta alelos (Tabela 3) e variam em até 15 aminoácidos, possuindo menos de 63% de homologia com outras enzimas da classe D de β -lactamases (Wang *et al.*, 2007). Embora seja um grupo numeroso, a atividade de carbapenemase é baixa e, muitas vezes, inativa. Este grupo de enzimas é intrínseco a *A. baumannii*, estando localizadas cromossomalmente, podendo não conferir resistência diretamente aos carbapenêmicos, que está condicionada a regulação da expressão gênica por Sequências de Inserção do tipo IS*Aba* (Lee *et al.*, 2009).

O quarto grupo possui a enzima OXA-58 e mais duas variantes, OXA-96 e OXA-97, cada uma com um ponto de mutação de diferença (Koh *et al.*, 2007 e Poirel *et al.*, 2008). Este grupo possui menos de 50% de homologia com os outros grupos de enzimas do tipo OXA (Walther-Rasmussen e Hoiby, 2006). OXA-58 foi primeiramente identificado em um isolado multiresistente de *Acinetobacter baumannii* na França, em 2003 (Poirel *et al.*, 2005). Desde então, essa variante vem sendo isolada em várias partes do mundo, como Europa, Américas, Ásia e África (Poirel *et al.*, 2006, Peleg *et al.*, 2008). Recentemente, foram descobertas novas variantes, OXA-97, na Tunísia e OXA-96, em Singapura. Ambas variantes foram identificadas em isolados de

Acinetobacter baumannii e possuem a mesma atividade catalítica da variante OXA-58 (Poirel *et al.*, 2010).

Recentemente, um novo grupo com atividade catalítica de carbapenemase foi identificado em um isolado clínico de *A. baumannii* no Brasil (Higgins *et al.*, 2009). Tal variante nova, identificada como OXA-143, possui 88% de similaridade de aminoácidos com OXA-40 (OXA-24), 63% com OXA-23, 52% com OXA-58 e, portanto, foi classificada como em um novo subgrupo de OXA-carbapenemase (Poirel *et al.*, 2010).

Em contraste com a heterogenicidade genética entre os diferentes grupos de carbapenemases OXA, membros do mesmo grupo normalmente apresentam em torno de 95% de homologia (Qi *et al.*, 2008). Quando grupos sem atividade de carbapenemases são comparados com aqueles que possuem essa atividade, a homologia cai drasticamente, podendo existir grupos com menos de 20% de identidade de aminoácidos (Queenan e Bush, 2007).

2.4 Sequências de Inserção ISAb

As sequências de inserção (IS) são os menores e mais abundantes elementos de transposição presentes no genoma bacteriano capazes de realizar transposição independente (Mugnier *et al.*, 2009). Sua ação no aumento da resistência consiste no fato de poderem conter regiões promotoras que aumentam a expressão de genes de resistência localizados posteriormente no genoma (Peleg *et al.*, 2008).

Em *Acinetobacter*, várias sequências de inserção tem sido descritas, cada uma em associação com genes específicos. São denominadas IS*Aba*, sendo as mais conhecidas IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3* e IS*Aba4*. Curiosamente, certos elementos como IS*Aba1* parecem estar unicamente relacionados com a espécie *A. baumannii* (Peleg *et al.*, 2008).

As carbapenemases do tipo OXA pertencentes aos grupos OXA-23, OXA-58 e OXA-51 com frequência possuem associação com esses elementos de inserção. OXA-23 é a mais comum e frequentemente possui elementos do tipo IS*Aba1* e IS*Aba4*, enquanto o grupo OXA-58 já foi descrito em associação com IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3* e IS18 (Poirel *et al.*, 2010). Já o grupo OXA-51 possui associação com IS*Aba1* e IS*Aba9*. Tal variedade corrobora com estudos que indicam que tais sequências, além de contribuir para a resistência bacteriana, também aumentam a plasticidade do genoma bacteriano (Figueredo *et al.*, 2009).

A presença de alelos intrínsecos do tipo *bla*_{OXA-51} pode não estar correlacionada com a diminuição da susceptibilidade a carbapenêmicos, aparentemente porque esse gene é regulado por sequências de inserção como IS*Aba1*. Esta sequência já foi associada à outros genes de resistência que não do tipo OXA, como *bla*_{AmpC} e *bla*_{SuII} nas espécies de *Acinetobacter* em que já foi descrito. Tais genes tem sua transcrição dependente de IS*Aba1*, que, nestas circunstâncias, atua como promotor genético (Turton *et al.*, 2006 [a]). Normalmente estão presentes em múltiplas cópias ao longo do genoma, onde em conjunto podem atuar simultaneamente em vários genes alvo (Héritier *et al.*, 2006).

Desse modo a resistência aos carbapenêmicos pode não ser inferida pela detecção de genes *bla*_{OXA-51}, mas sim, pela detecção deste em associação à tais elementos de inserção. Em contrapartida, a detecção de alelos genéticos que codificam enzimas do tipo OXA-23, OXA-24 e OXA-58 estão associados com, ao menos, a diminuição da susceptibilidade aos carbapenêmicos (Woodford *et al.*, 2006).

2.5 Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE)

A eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) é um método que se baseia na diferenciação de sequências de DNA de mesmo tamanho, mas de composição diferentes (Ercolini 2004). Tem sido amplamente utilizada para diversas finalidades, entre elas, o estudo de diversidade bacteriana, promovendo, desse modo, a caracterização da composição e dinâmica populacional de ambientes diversificados (Green, 2005). Também pode ser utilizada como uma ferramenta de biologia molecular para a caracterização de diferenças genotípicas entre diversas sequências genômicas de interesse, gerando fragmentos de DNA que diferem em sua composição nucleotídica (Henriques *et al.*, 2006)

DGGE é um método de separação eletroforética baseada nas diferenças do comportamento de anelamento das bases de nucleotídeos de fragmentos de DNA dupla fita. Quando separadas por eletroforese através de um gel de poliacrilamida com um aumento de gradiente desnaturante químico (normalmente formamida e uréia), a mobilidade da molécula é retardada na concentração desnaturante em que o DNA se separa parcialmente. Sequências

nucleotídicas diferentes geram gradientes de desnaturação diferentes, sendo a técnica sensível para a detecção de mudanças de apenas um par de bases. Em um gel de poliacrilamida, as condições desnaturantes são fornecidas pela uréia e pela formamida. Soluções desnaturantes com concentrações baixas e altas são preparadas, misturadas em uma solução de acrilamida de modo a formar um gel que contenha uma gradiente linear de desnaturação (Olaniran *et al.*, 2007).

Em um gel de DGGE, os fragmentos de DNA são submetidos a um aumento gradual do gradiente ambiental de desnaturação, e quando migram através desse gradiente, parcialmente desnaturam, formando regiões parcialmente aneladas. Esse evento cria moléculas ramificadas, retardando desse modo a migração da sequência de DNA analisada. Dessa maneira, fragmentos de DNA de mesmo tamanho possuem diferentes padrões de migração, dependendo do seu conteúdo e sequência de bases nitrogenadas: citosina (C), adenina (A) guanina(G) e timina (T). Melhores resultados em termos de resolução de gel tem sido observado quando os produtos (oriundo da reação de PCR prévia) não são totalmente separados, desse modo, a adição de grampos de alto conteúdo de CG (de 30-40 pb) na extremidade 5' de um dos oligonucleotídeos iniciadores faz com que uma esta região fique protegida do domínio de desnaturação. A visualização do padrão de migração pode ser realizada pela exposição à luz UV, após o gel sofrer tratamento com brometo de etídio ou outro agente que permita a visualização (Deng *et al.*, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados Bacterianos

Um total de 310 isolados (145 isolados bacterianos de origem clínica e 165 isolados de esgoto hospitalar) foram utilizados para a elaboração deste trabalho. Todos os isolados foram previamente confirmados como sendo do gênero *Acinetobacter* por amplificação do gene 16S rRNA e tiveram seu perfil de susceptibilidade testado para amicacina, ampicilina/sulbactam, aztreonam, cefepime, ceftazidima, ciprofloxacina gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina/tazobactam, trimeptropim/sulfametoxazol e ticarcilina/ácido clavulânico (Ferreira *et al.*, 2007). Dos isolados selecionados, 244 (78,7%) foram classificados como *A. baumannii* (153 isolados de efluente hospitalar e 91 isolados clínicos), uma vez que foram positivos para a amplificação de genes *bla*_{OXA-51-like}, e nenhum apresentou *bla*_{OXA-23}, segundo Ferreira (2010). Foram selecionados os isolados que apresentaram susceptibilidade diminuída aos carbapenêmicos e ou obtiveram resultado positivo para a presença do gene *bla*_{OXA-51}. Com finalidade de comparação, também foram selecionados 15 isolados sensíveis aos β -lactâmicos e um isolado resistente a piperacilina/tazobactam, totalizando 16 isolados.

Os isolados de origem clínica foram coletados em hospitais situados na cidade de Porto Alegre, RS: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Hospital São Lucas da PUCRS (HSL) e outros três pertencentes ao Grupo Hospitalar Conceição: Hospital Conceição, Hospital Cristo Redentor e Hospital Fêmeina. Já os isolados de origem ambiental pertencem ao esgoto de três grandes hospitais, também situados na cidade de Porto Alegre, RS: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Hospital São Lucas da PUCRS, Hospital Conceição. Todos os isolados foram coletados no período de 2007 e 2008.

3.2 Extração de DNA Bacteriano

Todos os isolados pertencentes a este estudo foram submetidos a extração de DNA total bacteriano através do método de extração orgânica desenvolvido inicialmente por Sambrook e cols (1989), com modificações para melhorar a eficiência de extração.

Para tanto, 50 μ L de uma suspensão bacteriana previamente armazenada em glicerol 30% e mantida sob -20°C foi inoculada em meio de cultura BHI (Caldo Infusão cérebro-coração, do inglês, Brain-Heart Infusion-Himedia) e cultivada a 35°C por 24-48h, até verificar-se crescimento bacteriano. Após o crescimento inicial, a suspensão de células resultantes foi centrifugada a 13.000 g por cinco minutos e descartado o sobrenadante excedente. O sedimento resultante então foi lavado com 700 μ L de tampão TES (TRIS-EDTA-NaCl, anexo 1) e novamente centrifugado na mesma rotação e tempo anteriormente citados. O sedimento resultante foi homogeneizado em 500 μ L de tampão TE1 (TRIS-EDTA, anexo 1). A esses 500 μ L de suspensão bacteriana foram adicionados 25 μ L de uma solução de lisozima (20mg/mL) e

incubada a 37°C por uma hora. Após esse período, foi adicionado à suspensão, 108µL de SDS 20% previamente aquecido à 60°C conjuntamente com 5 µL de proteinase K (20mg/mL) e incubou-se a 60°C por mais 15 minutos. Ao lisado de células foi adicionado um volume (650 µL) de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico (proporção 24:1) e agitado vigorosamente em agitador mecânico de tubos do tipo Vórtex até formar uma suspensão branca e espessa, a qual foi submetida à centrifugação de 13000g por 5 minutos e o sobrenadante coletado. Este procedimento foi repetido três vezes, sendo na última vez a solução de clorofórmio-álcool isoamílico substituída por uma de clorofórmio apenas. Ao sobrenadante foi adicionado 8 µL de uma solução de NaCl (5 M) e 500µL de álcool isopropílico (mantido a 4°C). A suspensão foi misturada e incubada a 0°C por no mínimo 10 minutos. A solução resultante foi centrifugada a 13000g por 15 minutos e o sobrenadante descartado, o precipitado lavado com 100µL de etanol 70% e centrifugado por mais 5 minutos a 13000g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco à temperatura ambiente. Finalmente, o precipitado foi suspenso em 70 µL de TE2 (TRIS- EDTA, anexo 1) e adicionado 5µL de RNase (na concentração 20µg/mL). A suspensão contendo o DNA bacteriano total foi mantida a -20°C para as análises posteriores.

3.3 Pesquisa dos genes *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, da Sequência de Inserção *ISAb_a1* e da associação de *ISAb_a1* com os genes *bla*_{OXA}.

A identificação dos isolados portadores de genes *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, de *ISAb_a1* e da associação de *ISAb_a1* com *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-58} foi realizada

por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão listados na Tabela 4.

Tabela 4: Listagem de Oligonucleotídeos utilizados para a realização de PCR e de PCR para técnica de DGGE.

Oligonucleotídeos	Sequências	Referência
OXA-24 A	5'- GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA -3'	Woodford <i>et al.</i> ,
OXA-24 B	5'- AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT -3'	2006.
OXA-58 A	5'- AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG -3'	Woodford <i>et al.</i> ,
OXA-58 B	5'- CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC -3'	2006.
ISAb _a 1 F	5'- CAC GAA TGC AGA AGT TG -3'	Turton <i>et al.</i> ,
ISAb _a 1 R	5'- CGA CGA ATA CTA TGA CAC -3'	2006 [a].
OXA-51 A	5'- TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG -3'	Woodford <i>et al.</i> ,
OXA-51 B	5'- TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG -3'	2006.
OXA-51-like-all F	5'- ATG AAC ATT AAA GCA CTC -3'	Turton <i>et al.</i> ,
OXA 51-like-all R	5'- CTA TAA AAT ACC TAA TTG TTC -3'	2006 [a].
OXA-51 DGGE	5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCG CGG CCG CGC TAA TGC TTT CAT CGG CCT TG -3'	Este estudo e Woodford <i>et al.</i> , 2006.
Acin16S F	5' - CCT TGC GYT AAT AGA TGA GC -3'	Ferreira <i>et al.</i> ,
Acin16S R	5' - GTA GCA ACC CTT TGT ACC GA -3'	2007

A análise da presença do gene *bla*_{OXA-24} foi realizada com o kit de reação GoTaq[®] Colorless Master Mix (Promega Corporation), onde foi adicionado apenas os oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 1µM, o DNA diluído 5x e água deionizada estéril para completar o volume total de reação. Para uma reação, foi adicionada 7,5µL de GoTaq[®] Colorless Master

Mix, 1µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,5µL de água deionizada estéril e 2 µL de amostra do DNA bacteriano, totalizando um volume final de 15 µL. A reação de PCR foi realizada em termociclador (Mastercycler personal 5322 v.2.22.32 - Eppendorf) com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final de 6 minutos a 72°C.

A presença do gene *bla*_{OXA-58} foi realizada através de PCR usando kit de reação GoTaq[®] DNA Polymerase. Este kit é vendido comercialmente com adição de cloreto de magnésio na concentração final de reação de 1,5 mM e tampão da enzima na concentração de 5X. Para a amplificação do gene desejado, foi necessário suplementar o cloreto de magnésio até que atingisse uma concentração final de 4,5 mM. A concentração de dNTPs foi padronizada em 250 µM, a de oligonucleotídeos iniciadores em 1 µM e de Taq polimerase em 1U/reação. A reação foi realizada com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 94°C por 25 segundos (desnaturação), 54°C por 40 segundos (anelamento) e 72°C por 50 segundos (extensão) e uma extensão final de 6 minutos a 72°C.

A reação para a presença da sequência de inserção *ISAb₁* foi realizada com *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen) em que as concentrações utilizadas de cloreto de magnésio, de dNTPs e de oligonucleotídeos iniciadores foram 4 mM, 300 µM e 1 µM, respectivamente. A reação foi submetida a um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 56°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 3 minutos. Por fim, a reação foi

submetida a um ciclo de extensão final por 5 minutos a 72°C. Também foi realizada a pesquisa da associação de *ISAb1* com os genes *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-58}. Para tanto, foi utilizada a combinação de oligonucleotídeos iniciadores *ISAb1* F com OXA-51 B e OXA-58 B, para a amplificação da localização de *ISAb1* em *bla*_{OXA-51} e em *bla*_{OXA-58}, respectivamente. A reação utilizada foi a mesma para a confirmação de *ISAb1*, modificando apenas a temperatura de anelamento para 58°C e os oligonucleotídeos reversos.

Os fragmentos amplificados de todas as reações acima descritas foram visualizados em luz ultravioleta (UV) através de géis de agarose 1%, confeccionados com tampão TAE 1X (TRIS-acetato-EDTA) e brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. O tamanho de fragmentos observados foram de 246 pb para o gene *bla*_{OXA-24}, 599 pb para o gene *bla*_{OXA-58}, 549 pb para *ISAb1* e aproximadamente 1,2kb para os fragmentos que indicam as associações entre *ISAb1/bla*_{OXA-51} e *ISAb1/bla*_{OXA-58}. O marcador molecular utilizado foi o 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs Inc.)

3.4 DGGE- Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação

Esta técnica foi utilizada para a diferenciação dos fragmentos obtidos pela amplificação do gene *bla*_{OXA-51}.

O desenho do oligonucleotídeo iniciador para a técnica de DGGE foi feito a partir do alinhamento de 29 alelos incluídos na família OXA-51, através do programa computacional CLC Sequence Viewer 5.0 (Anexo 2). A análise dos dados obtidos mostrou que o melhor par de oligonucleotídeos iniciadores capazes de abranger uma gama maior de mutações entre as sequências foi

aquele já descrito por Woodford e cols , 2006. Portanto, a esse oligonucleotídeo iniciador foi adicionado um grampo composto por uma sequência de aproximadamente 40 nucleotídeos do tipo guanina e citosina, como mostra a Tabela 4.

A reação de PCR foi realizada com Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) utilizando uma concentração de dNTPs, de cloreto de magnésio e de oligonucleotídeos iniciadores de 300 μ M, 4,5 mM e 1 μ M, respectivamente. O programa de reação utilizado foi o mesmo realizado para a amplificação do gene *bla*_{OXA-58}, aumentando-se a temperatura de anelamento para 61°C.

As diferentes amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com gradiente de desnaturação variando de 30-60%. O tampão utilizado para confeccionar o gel e realizar a eletroforese foi TAE (1X).

Os gradientes de 30% e 60% são obtidos pela mistura de solução 100% desnaturante com uma solução que não contém desnaturante algum (0%). A solução de 100% é composta por uréia, na concentração de 7M e formamida deionizada na concentração de 40%, além de acrilamida (10%), tampão TAE (50X) e glicerol (5%). A solução 0% é composta apenas por acrilamida (10%), tampão TAE (50X) e glicerol (5%). O glicerol foi adicionado com finalidade de aumentar a resistência do gel formado. Para a polimerização do gel de poliacrilamida com gradiente de desnaturação foram adicionados de solução de persulfato de amônio a uma concentração final de 0,06% e de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino) a uma concentração final de 0,15%.

A migração eletroforética foi realizada em tampão TAE 1X durante 15 minutos a 50 V, seguido por 16 horas a 100 V, mantendo-se constante a temperatura de 60°C. Após a migração, o gel foi corado com banho de brometo de etídio (solução de 0,5 µg/mL) por 40 minutos e descorado por 20 minutos em tampão TAE 1X. A análise dos resultados obtidos foi realizada através de visualização em luz ultravioleta (UV) e posterior fotodocumentação pelo sistema KODAK® Digital Science 1D Image Analysis Software (versão 2.0,2.0.2,2.0.2 Windows).

3.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O isolado produtor do gene *bla*_{OXA-58} foi submetido a confirmação de seu perfil de susceptibilidade aos antibióticos imipenem, gentamicina e ceftazidima através do teste de Microdiluição em Caldo para a determinação de suas concentrações inibitórias mínimas, seguindo as normas preconizadas internacionalmente (CLSI, 2010).

Esta metodologia consistiu no crescimento do isolado de interesse em soluções de diluições seriadas do antibiótico analisado em caldo Müller Hinton (Himedia). As diluições variaram de 512µg/mL a 1µg/mL do antimicrobiano testado. Em todos os testes, foram utilizados controles positivos, onde foi observado o crescimento bacteriano no meio de cultura sem o antimicrobiano, e controles negativos, em que o meio de cultura não foi inoculado com a cultura bacteriana.

Os valores de referência e pontos de corte para a determinação da susceptibilidade e/ou resistência seguiram o padrão aceito para o gênero *Acinetobacter*. Deste modo, para imipenem e gentamicina, a CIM padrão de

resistência é ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$, sendo considerado intermediário CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$ e sensível CIM de ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$. Para ceftazidima, a resistência é considerada com CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$, intermediário, CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$ e sensível quando a CIM é ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2010).

3.6 Sequenciamento dos genes *bla*_{OXA-58} e dos fragmentos obtidos pelo DGGE.

Os isolados que apresentaram mobilidade diferenciada no DGGE, tiveram os fragmentos do gene *bla*_{OXA-51} reamplificados através da utilização dos oligonucleotídeos iniciadores específicos OXA-51 A e OXA-51B (Tabela 4), em que as condições de reação foram exatamente as mesmas utilizadas pela amplificação dos fragmentos utilizados na técnica de DGGE, alterando-se apenas a temperatura de anelamento para 54°C.

O isolado que apresentou o gene *bla*_{OXA-58}, foi submetido a amplificação, além do gene de interesse, da ORF (open reading frame – fase aberta de leitura) completa do gene *bla*_{OXA-51}, bem como do gene 16S rRNA. Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram OXA-58 A e B, OXA-51like-all F e R e Acin16S F e R (Tabela 4), respectivamente. A reação para a amplificação da ORF completa do gene *bla*_{OXA-51} foi realizada nas mesmas condições que a amplificação utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores OXA-51 A e B, porém a temperatura de anelamento foi modificada para 46°C.

Já a reação para a amplificação de parte do gene 16S rRNA foi realizada em uma reação de 30 μL e utilizando o sistema GoTaq® Colorless Master Mix (Promega). Para tanto, a reação contou com 15 μL do mix comercial, 1 μM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2 μL de amostra de DNA

bacteriano e 11 μ L de água deionizada esterilizada. O programa de reação contou com um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos de 25 ciclos de 95°C de temperatura de desnaturação por 1 minuto, 52°C de temperatura de anelamento por mais 1 minuto e 72°C de temperatura de extensão por 1 minuto, finalizando com uma extensão final de 8 minutos a 72°C.

O processo de purificação foi realizado utilizando os kits comerciais EZ-10 Spin Column PCR Purification e EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction (Bio Basic INC.) seguindo as normas do fabricante. A quantificação foi realizada através do programa Kodak[®] 1D Image Analysis Software, sendo utilizado o marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs Inc.) como parâmetro de comparação para a quantificação. Apenas as amostras que obtiveram quantidade de 20 a 60ng de DNA em 6 μ L foram submetidas ao seqüenciamento automatizado (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer).

3.7 Análise de dados

A análise dos dados obtidos pelo sequenciamento foi realizada através do uso dos programas computacionais CLC Sequence Viewer, versão 5.0, BioEdit Sequence Alignment Editor, versão 7.0.5.3 e o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool — GenBank). As sequencias foram lidas e comparadas com a base de dados publicada no GenBank. As análises foram realizadas com as maiores homologias encontradas para cada isolado. A análise filogenética foi realizada utilizando o algoritmo UPGMA, com Bootstrap de 1000X.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gênero *Acinetobacter* tem se destacado mundialmente por ser um patógeno responsável por grandes surtos de IAAS. A emergência de cepas multirresistentes tem papel fundamental nesse cenário, uma vez que tornam essas infecções de difícil tratamento (Peleg *et al.*, 2008). Este trabalho buscou encontrar mecanismos que justificassem o perfil de multirresistência encontrado nos isolados de origem clínicas em comparação com os isolados de origem ambiental (esgoto hospitalar) através de análise genotípica e de diversidade dos principais genes envolvidos nesse processo.

4.1 Amplificação dos genes *bla*_{OXA-24-like} e *bla*_{OXA-58-like}

Foram incluídos nesse estudo, 310 isolados, sendo 145 isolados de origem clínica e 165 isolados de origem ambiental (efluente hospitalar), que foram submetidos à análise dos genes *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, da sequência de inserção IS*Aba1* e de sua relação com os genes *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-58}.

Nenhum isolado apresentou amplificação para o gene *bla*_{OXA-24}, corroborando com estudos anteriores, que afirmam que esta família é pouco disseminada na América do Sul, não sendo descrito nenhum isolado no Brasil até o momento (Dalla-Costa *et al.*, 2003, Brown e Amyes, 2006, Martins, *et al.*, 2009 e Takagi, *et al.*, 2009).

Apenas um isolado clínico foi positivo para o gene *bla*_{OXA-58}. Este isolado teve seu perfil de susceptibilidade confirmada através da realização de CIM. Os valores encontrados para imipenem, gentamicina e ceftazidima foram 64 µg/mL, ≥ 512µg/mL e 8µg/mL, indicando resistência para imipenem e gentamicina e sensibilidade para ceftazidima. Este isolado, denominado IC 9, também foi positivo para a presença de *bla*_{OXA-51-like}, bem como para a sequência de inserção *ISAba1*. Testes de amplificação adicionais mostraram que esta sequência estava localizada imediatamente anterior aos genes *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-58} (Fig 1A e 1B), confirmando a associação de *ISAba1* com esses genes.

Até o momento, nenhum gene dessa família havia sido descrita no Brasil, sendo esta sua primeira ocorrência neste país. A análise do sequenciamento mostrou que este gene obteve 100% de homologia com *bla*_{OXA-58} de *Acinetobacter baumannii*. Esta enzima foi primeiramente descrita na França em um surto de infecção associada à assistência a saúde em 2003 e desde então, vem sendo encontrada em todos os continentes (Poirel *et al.*, 2005, Pournaras *et al.*, 2006 e Marti *et al.*, 2008). Este achado corrobora com estudo prévio que confirmam que a disseminação da carbapenemases OXA-58 é facilitada, pois se trata de uma enzima que pode ser codificada por plasmídeo, fato que pode aumentar a frequência de dispersão do gene (Poirel e Nordmann, 2006 [b]).

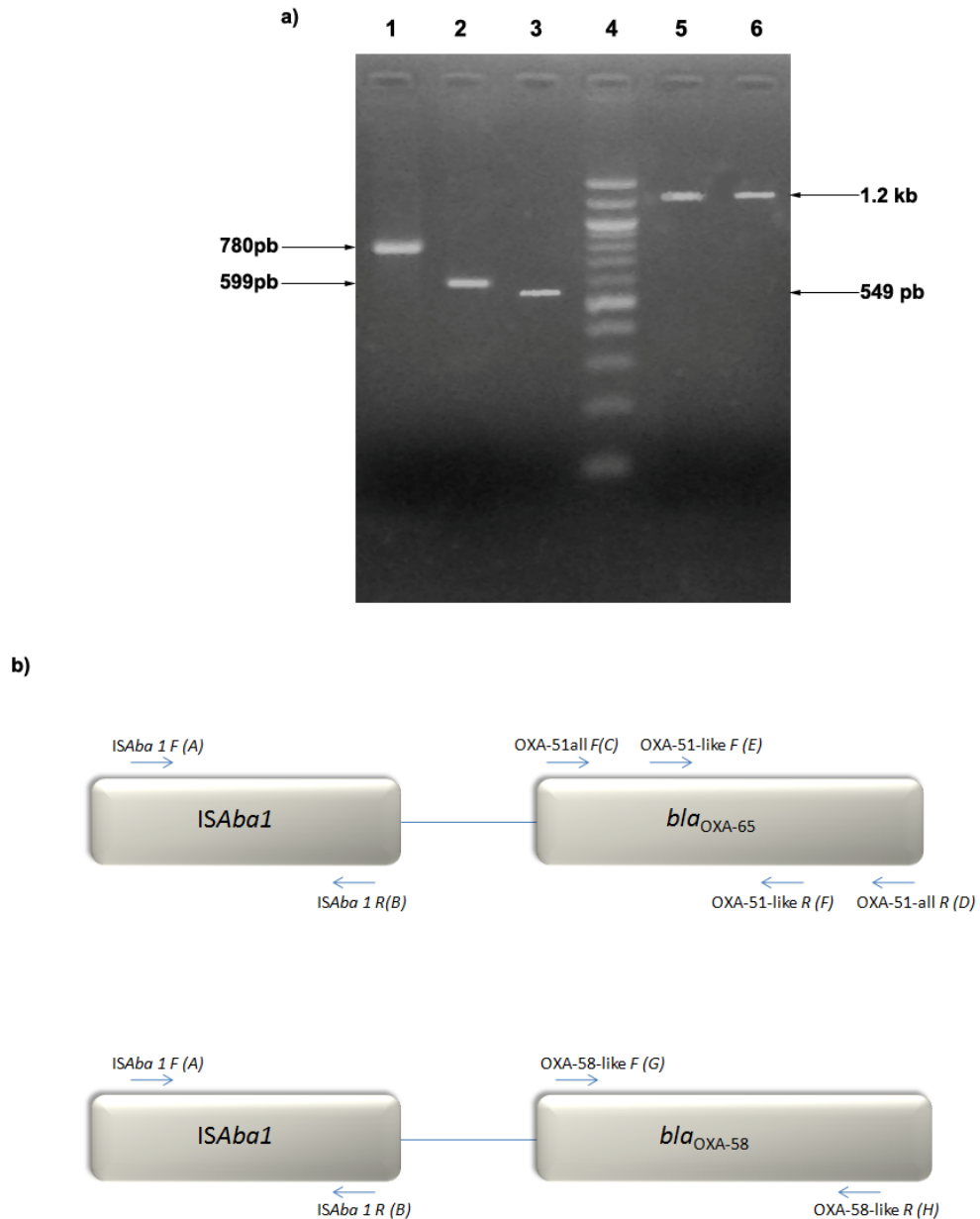


Figura 1: Eletroforese realizada para os fragmentos amplificados do isolado positivo para bla_{OXA-58} e suas relações com *ISAbal*. **1a** – Gel de agarose 1% com os produtos de PCR obtidos usando os oligonucleotídeos iniciadores *ISAbal*, OXA-51-like, OXA-51-like-ALL e OXA-58-like. **Linha 1** – produto de PCR do gene bla_{OXA-65} com os oligonucleotídeos iniciadores OXA-51-like-ALL F (C) e R (D); **Linha 2** – produto de PCR do gene bla_{OXA-58} com os oligonucleotídeos iniciadores OXA-58 F (G) e R (H); **Linha 3** – Produto de PCR da sequência *ISAbal* com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores *ISAbal* F (A) e *ISAbal* R (B); **Linha 4** – marcador molecular de 100 bp; **Linha 5** – Mapeamento por PCR da sequência *ISAbal* e o gene bla_{OXA-65} com os oligonucleotídeos iniciadores *ISAbal*F (A) and OXA-51-like R (F); **Linha 6** – Mapeamento por PCR da sequência *ISAbal* e o gene bla_{OXA-58} com os oligonucleotídeos iniciadores *ISAbal*F (A) e OXA-58-like R (H). **1b** – Representação esquemática dos produtos obtidos por PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores *ISAbal*, OXA-51-like, OXA-51-like-ALL e OXA-58-like com a posição de todos os oligonucleotídeos mencionados na figura 1a.

Na América do Sul, essa enzima é prevalente e um grande problema de saúde pública em países como Venezuela e Argentina, onde foram descritas pela primeira vez em 2007 e 2006, respectivamente, em graves surtos de infecção hospitalar (Coelho *et al.*, 2006 e Salazar De Vegas *et al.*, 2007).

Na Argentina, contrastando com os achados desse trabalho, as CIMs encontradas para imipenem variaram de 8 a 32µg/mL, o que indica um baixo nível de resistência ao antibiótico (Coelho *et al.*, 2006 e Merkier *et al.*, 2008). No entanto, no isolado deste estudo, os resultados indicam que mecanismos de resistência adicionais podem estar atuando, uma vez que a CIM para imipenem foi maior (64µg/mL) e, dessa maneira, a sequência de inserção *ISAbal1*, encontrada anterior aos genes *bla*_{OXA-65} e *bla*_{OXA-58} (Figura 1 e Tabela 5), pode justificar o nível de resistência elevado, como observado em estudo similar (Chen *et al.*, 2008).

Os produtos de PCR do isolado IC 9 foram confirmados através de sequenciamento de DNA. As sequências estão registradas no GenBank sob os números de acesso HM 626370, HM 626369 e HM 626368 e referem-se as sequências parciais obtidas da amplificação do gene 16S rRNA, ao gene *bla*_{OXA-65}, da família do OXA-51 e ao gene *bla*_{OXA-58}, respectivamente.

O gene *bla*_{OXA-65} é intimamente relacionado aos alelos *bla*_{OXA-66} e *bla*_{OXA-69}, variando em apenas um aminoácido para a variante OXA-66 e em quatro substituições para OXA-69 (Figura 2) (Ikonomidis *et al.*, 2007). A variante OXA-65 foi primeiramente descrita na Argentina e possui 98% de similaridade genética com OXA-51 (Brown e Amyes, 2005).

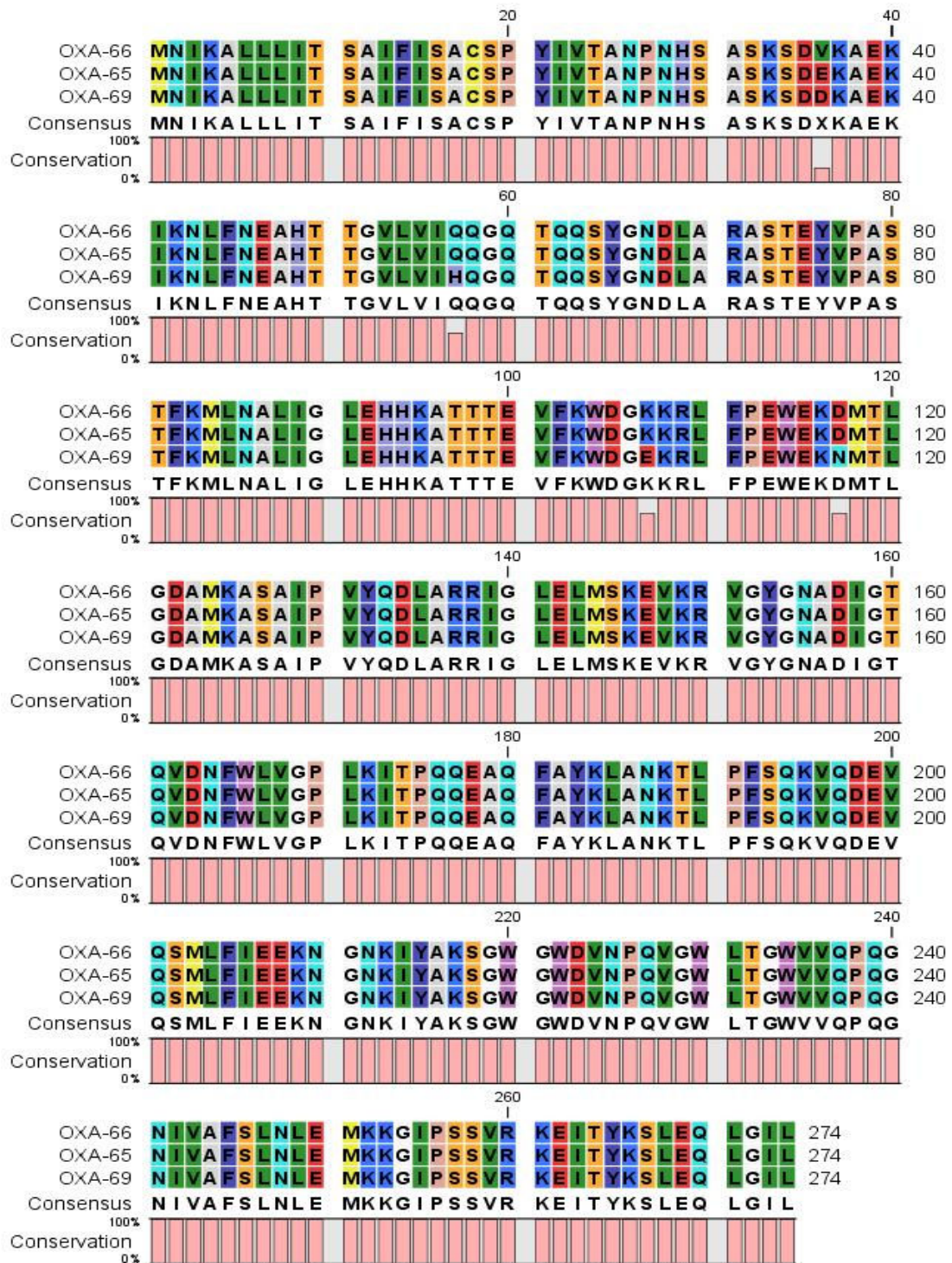


Figura 2: Alinhamento das proteínas traduzidas pelos genes *bla*_{OXA-66}, *bla*_{OXA-65} e *bla*_{OXA-69}, intimamente relacionados. As substituições de aminoácidos podem ser observadas nas posições 36, 57, 107 e 117. Para OXA-66, na posição 36 há uma substituição de um ácido glutâmico (E) por uma valina (V). Para OXA-69, são quatro resíduos mutados, na posição 36, há uma substituição de um ácido glutâmico (E) por um resíduo de aspartato (D), na 57, uma substituição de uma glutamina (Q) por uma histidina (H), na 107, uma lisina (K) é substituída por um ácido glutâmico (E) e na 117, onde um resíduo de aspartato (D) é substituído por um resíduo de asparagina (N). O alinhamento foi realizado utilizando o programa CLC Sequence Viewer versão 5.1.

4.2 Pesquisa de ISAb_a1 e de sua relação com bla_{OXA-51-like}

Conforme apresentado nas Tabelas 5 e 6, a presença da sequência de inserção ISAb_a1 foi frequente, e encontrada em 288 (92,9%) isolados de *Acinetobacter* sp. testados (233 isolados de *Acinetobacter baumannii*, sendo 89 isolados clínicos e 144 isolados ambientais e em 55 isolados de *Acinetobacter* sp. – 43 de origem clínica e 12 de origem ambiental), porém, a associação ISAb_a1/OXA-51 foi encontrada em apenas 24 (26,9%) isolados clínicos e 16 (11,1%) isolados ambientais de *A. baumannii* com a presença de ISAb_a1.

As Tabelas 5 e 6 expõem os resultados obtidos nesse estudo, mostrando o perfil de susceptibilidade relacionado à presença dos genes analisados e da associação com a sequência de inserção ISAb_a1. De acordo com a literatura, ISAb_a1 é frequentemente encontrada no gênero *Acinetobacter*, especialmente na espécie *A. baumannii*, onde foi primeiramente descrita (Héritier *et al.*, 2006).

Esta sequência tem sido associada à expressão de resistência bacteriana pois pode conter elementos que atuam como promotores genéticos. Esse fato já foi extensivamente estudado em genes como bla_{AmpC} e bla_{OXA-51}, que podem conferir resistência à cefalosporinas e aos carbapenêmicos, respectivamente (Héritier *et al.*, 2006 e Pfeifer *et al.*, 2010).

Tabela 5: Perfil de susceptibilidade encontrado em associação com perfil genético de isolados clínicos de *Acinetobacter* sp.

Perfil	Número total de Isolados	Perfil de Susceptibilidade diminuída	OXA-51	ISAb _a 1	ISAb _a 1+ OXA-51 R	OXA-58	ISAb _a 1+ OXA-58 R
1	43	AMI, AMS, CPM, CAZ, GEN, IPM, MEM, TZP, SUT*	18	39	2	-	-
2	1	AMI, AMS, CPM, CAZ, GEN, IPM, TZP, SUT	1	1	-	-	-
3	4	AMI, AMS, CPM, GEN, IPM, MEM, TZP, SUT	1	4	1	-	-
4	2	AMI, AMS, CPM, CAZ, GEN, IPM, MEM, TZP	2	1	-	-	-
5	2	AMI, CPM, CAZ, GEN, IPM, MEM, TZP, SUT	2	2	1	-	-
6	5	AMI, AMS, CPM, CAZ, IPM, MEM, TZP	5	5	4	-	-
7	6	AMI, AMS, CPM, CAZ, GEN, TZP, SUT	6	6	-	-	-
8	1	AMS, CPM, GEN, IPM, MEM, TZP, SUT	1	1	1	1	1
9	6	AMI, CPM, CAZ, GEN, IPM, MEM, TZP	4	6	2	-	-
10	1	AMI, AMS, CPM, CAZ, GEN, SUT	1	1	-	-	-
11	1	AMI, CPM, CAZ, GEN, MEM, SUT	-	1	-	-	-
12	5	AMI, CPM, CAZ, GEN, TZP, SUT	4	5	-	-	-
13	7	AMI, CPM, CAZ, IPM, MEM, TZP	5	7	2	-	-
14	1	AMI, CPM, GEN, IPM, MEM, TZP	1	1	-	-	-
15	2	AMI, CPM, CAZ, GEN, SUT	2	2	-	-	-
16	1	CPM, CAZ, GEN, TZP, SUT	1	1	1	-	-
17	1	CPM, CAZ, IPM, MEM, TZP	-	1	-	-	--
18	6	AMI, CPM, CAZ, GEN, TZP	6	5	-	-	-
19	2	AMI, AMS, CPM, CAZ, TZP	2	2	1	-	-
20	9	AMI, CPM, CAZ, TZP	8	9	4	-	-
21	1	AMI, CPM, GEN, SUT	1	1	-	-	-
22	1	AMI, CPM, IPM, MEM	-	1	-	-	-
23	2	AMI, GEN, IPM, MEM	1	2	-	-	-
24	1	CPM, CAZ, TZP, SUT	1	1	-	-	-

Tabela 5 - continuação

Perfil	Número total de Isolados	Perfil de Susceptibilidade Diminuída	OXA-51	ISAba 1	ISAba1+ OXA-51 R	OXA-58	ISAba1+ OXA-58 R
25	1	CPM, CAZ, TZP	1	1	1	-	-
26	1	CAZ, TZP	1	-	-	-	-
27	1	CPM, CAZ	1	1	-	-	-
28	1	TZP, SUT	1	1	-	-	-
29	2	CAZ	1	2	-	-	-
30	1	TZP	-	1	-	-	-
31	27	SENSÍVEIS A TODOS OS β -LACTÂMICOS	13	23	4	-	-

*AMI: amicacina (30 μ g), AMS: ampicilina/sulbactam (10/10 μ g), CPM: cefepime (30 μ g), CAZ : ceftazidima (30 μ g), GEN: gentamicina (10 μ g), IPM: imipenem (10 μ g), MEM: meropenem (10 μ g), TZP: piperacilina/tazobactam (100/10 μ g), SUT (trimetropim/sulfametoxazol (1,25/23,75 μ g)

Tabela 6: Perfil de susceptibilidade encontrado em associação com perfil genético de isolados de efluente hospitalar de *Acinetobacter* sp.

Perfil	Número total de isolados	Perfil de Susceptibilidade Diminuída	OXA-51	ISAba1	ISAba1+ OXA-51 R
1	2	AMI, ATM, CAZ, CPM, CIP, GEN, IPM, MEM, TZP, TIC *	2	2	-
2	13	AMI, ATM, CAZ, CPM, CIP, GEN, MEM, TZP, TIC	12	13	4
3	2	AMI, ATM, CAZ, CPM, CIP, GEN, MEM, TIC	-	2	-
4	15	AMI, ATM, CAZ, CPM, CIP, GEN, TZP, TIC	15	15	3
5	1	AMI, ATM, CAZ, CPM, CIP, MEM, TZP, TIC	1	1	-
6	2	ATM, CAZ, CPM, CIP, GEN, MEM, TZP, TIC	-	2	-
7	20	AMI, ATM, CAZ, CPM, CIP, GEN, TIC	20	20	2
8	4	AMI, ATM, CAZ, CPM, CIP, TZP, TIC	4	4	-
9	1	AMI, ATM, CAZ, CPM, CIP, GEN, TZP	1	1	-
10	2	AMI, CIP, GEN, IPM, MEM, TZP, TIC	-	2	-
11	1	AMI, ATM, CAZ, CPM, CIP, GEN, MEM	-	1	-
12	7	AMI, ATM, CAZ, CPM, CIP, TIC	7	7	-
13	1	AMI, CIP, GEN, IPM, MEM, TIC	-	1	-
14	1	AMI, ATM, CPM, CIP, GEN, TIC	1	1	-
15	1	AMI, ATM, CAZ, CIP, GEN, TIC	1	1	1
16	3	AMI, ATM, CAZ, CPM, CIP, GEN	3	3	-
17	1	ATM, CAZ, CPM, CIP, GEN, TIC	1	1	-
18	1	ATM, CAZ, CPM, MEM, TZP, TIC	1	1	-
19	1	AMI, ATM, GEN, MEM, TZP	1	1	-
20	1	AMI, CIP, GEN, MEM, TIC	-	1	-
21	1	AMI, ATM, CAZ, CIP, GEN	1	1	1
22	1	AMI, ATM, CAZ, MEM	1	-	-
23	1	AMI, ATM, CAZ, TZP	1	1	1
24	1	AMI, ATM, CAZ, CPM	1	-	-
25	2	AMI, CIP, GEN, TIC	2	2	-
26	2	ATM, CAZ, CPM, CIP	1	2	-
27	1	ATM, CAZ, CIP, TZP	1	1	-
28	1	ATM, CAZ, CPM, TZP	1	1	-
29	1	AMI, ATM, GEN	1	1	-
30	3	AMI, ATM, CAZ	3	3	-
31	1	ATM, CAZ, CPM	1	1	-
32	1	ATM, CAZ, GEN	1	1	-
33	1	ATM, CAZ, TIC	1	1	-
34	9	AMI, ATM	9	9	1
35	9	ATM, CAZ	9	7	-
36	1	ATM, TZP	1	1	-
37	31	ATM	31	28	2
38	18	SENSÍVEL A TODOS β -LACTÂMICOS	17	14	1

*AMI: amicacina (30 μ g), ATM: aztreonam (30 μ g), CIP: ciprofloxacina (5 μ g), CPM: cefepime (30 μ g), CAZ : ceftazidima (30 μ g), GEN: gentamicina (10 μ g), IPM: imipenem (10 μ g), MEM: meropenem (10 μ g), TZP: piperacilina/tazobactam (100/10 μ g), TIC: ticarcilina/ ácido clavulânico (75/10 μ g)

Neste estudo, foram considerados multirresistentes, os isolados de *Acinetobacter* sp. que apresentaram resistência a pelo menos tres das classes de antibióticos testadas: aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), penicilinas semi-sintéticas em associação com inibidores de β -lactamases (ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam), cefalosporinas, (ceftazidima e cefepime) carbapenêmicos (imipenem e meropenem) e a associação sulfametoxazol/trimetropim para os isolados clínicos e monobatâmico (aztreonam), aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), cefalosporinas (ceftazidima e cefepime), carbapenêmicos (imipenem e meropenem), quinolona (ciprofloxacina) e penicilinas semi-sintéticas em associação com inibidores de β -lactamases (piperacilina/tazobactam e ticarcilina/ácido clavulânico) para os isolados ambientais.

Deste modo, dos 165 isolados ambientais incluídos no estudo, 95 (57,5%) foram considerados multirresistentes e dos 145 isolados clínicos, 112 (77,2%) foram considerados multirresistentes. Nestes 207 isolados, a sequência de inserção IS*Aba1* foi encontrada em 198 (93 ambientais e 105 clínicos), representando 97,8% em isolados ambientais e 93,7% em isolados clínicos.

Quando analisamos apenas isolados de *Acinetobacter baumannii*, a sequência de inserção IS*Aba1* foi encontrada em 152 isolados de multirresistentes, sendo 81 isolados ambientais e 71 isolados clínicos, correspondendo a uma frequência de 85% nos isolados ambientais e de 63% nos isolados clínicos.

A frequência de *ISAb_a1* em isolados ambientais multirresistentes foi maior que em isolados clínicos (85% em isolados de efluente em comparação com 63% em isolados clínicos). Este dado é de extrema importância, uma vez que, embora existam estudos relacionados à multirresistência à isolados de origem ambiental (Gusatti *et al.*, 2009, Yang *et al.*, 2009), poucos estudos relatam a pesquisa de genes de carbapenemases e de *ISAb_a1* neste tipo de isolado. A disseminação desses genes no ambiente é de extrema importância, uma vez que esta bactéria pode atuar como reservatório de genes de resistência a antimicrobianos e esta sequência, por suas propriedades genéticas, contribui para o aumento de isolados multirresistentes (Zhang *et al.*, 2009 e Girlich *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, a associação *ISAb_a1/OXA-51* foi baixa e presente apenas em 26,9% dos isolados clínicos e 11,1% dos isolados ambientais. Quando se consideram apenas os isolados multirresistentes, esses índices variam para 26,7% do isolados clínicos e para 14,8% dos isolados de esgoto hospitalar de *A. baumannii* que apresentaram a *ISAb_a1*. A baixa frequência dessa associação, em contraste com a alta frequência da IS sozinha, pode ser explicada pelo fato de *ISAb_a1* conter elementos capazes de realizar transposição (são considerados os menores e mais abundantes elementos de transposição) e de terem a capacidade de se inserir em diferentes regiões do genoma, atuando como promotores genéticos, quando anteriores a genes de resistência, ou não, estando dispersos ao longo do genoma aleatoriamente (Mugnier *et al.*, 2009).

A associação IS*Aba1*/OXA-51 também foi observada em sete isolados com susceptibilidade diminuída a alguns dos antibióticos testados, mas não considerados multirresistentes, e em cinco isolados sensíveis a todos os β -lactâmicos testados (quatro isolados de origem clínica e 1 isolado ambiental). A presença da associação IS*Aba1*/OXA-51 em isolados com susceptibilidade diminuída e sem resistência aos carbapenêmicos (não considerados multirresistentes) encontrado neste estudo (perfis 20 e 25 da tabela 5 e perfil 37 da tabela 6) e em isolados sensíveis aos β -lactâmicos (perfil 31 da tabela 5 e 38 da tabela 6) , indica que esta associação pode não estar atuando como promotor genético nesses isolados, contrariando dados da literatura que mostram o aumento da resistência aos carbapenêmicos (Segal *et al.*, 2007).

Uma justificativa para esses resultados anômalos seria a baixa expressão das enzimas do tipo OXA-51. Estudos anteriores afirmam que sequências de inserção como IS*Aba1* podem sofrer eventos de mutação quando fazem transposição, e dessa maneira podem adquirir promotores que aumentam a expressão de genes ou perdê-los, diminuindo essa expressão (Segal *et al.*, 2005). Outros estudos afirmam que, pela plasticidade genômica encontrada nos gêneros bacterianos e sua susceptibilidade às mudanças ambientais, algumas proteínas podem estar truncadas (como enzimas de resistência a antimicrobianos), resultado de mutações no DNA, tornando-se não-funcionais (Tennstedt, *et al.*, 2003). Para a confirmação dessas hipóteses, estudos de expressão enzimática de proteínas do tipo OXA-51 encontradas

neste estudo devem ser realizados, além da pesquisa de outros mecanismos de resistência bacteriana nos isolados com susceptibilidade diminuída.

Contrariando o esperado, 127 isolados multirresistentes (39 clínicos e 88 ambientais), embora positivos para *ISAb_a1* e para o gene *bla_{OXA-51}*, não tiveram a associação *ISAb_a1/OXA-51* positiva, indicando que a multirresistência, nesse caso, pode estar associada a outros fatores, que não os pesquisados neste estudo.

Nestes isolados, outros mecanismos de resistência podem estar atuando, resultando no fenótipo encontrado. A presença de outra sequência de inserção do tipo *ISAb_a*, como a *ISAb_a9*, já foi documentada, em estudo anterior, como responsável pelo aumento da resistência em isolados de *A. baumannii* pois, naquele isolado, atuou de maneira semelhante a *ISAb_a1*, como promotor de *bla_{OXA-51}* (Figueredo *et al.*, 2009).

Outros mecanismos que conferem resistência podem estar atuando em conjunto e justificando a multirresistência. Além disso, a presença de outras enzimas de resistência podem ser as responsáveis pelo fenótipo dos isolados em questão. Muitos isolados multirresistentes de *Acinetobacter* sp. tem o seu perfil justificado pela super-expressão de bombas de efluxo e por perda de porinas, aliados a outros fatores genéticos como a expressão de enzimas de resistência, como as β -lactamases (Bratu, *et al.*, 2008, Fernández-Cuenca *et al.*, 2003, Lee, *et al.*, 2010 e Poirel e Nordmann, 2006 [a]).

4.3 Diversidade dos genes *bla_{OXA-51-like}*

Para a análise da diversidade dos genes amplificados pelos oligonucleotídeos iniciadores OXA-51-like, foram escolhidos 75 isolados

ambientais e 127 isolados de origem clínica, totalizando 202 isolados utilizados. A seleção baseou-se nas diferenças entre os perfis de susceptibilidade, na origem de cada isolado (isolados de mesmo paciente, em caso de origem clínica, só foram considerados se tivessem perfil de susceptibilidade diferentes), e no perfil de PFGE e ERIC-PCR realizado em estudo anterior (Ferreira *et al.*, 2010).

Normalmente utilizada para analisar diversidade genética em amostras ambientais totais, a técnica de DGGE é capaz de diferenciar em nível de sequência de nucleotídeos, diferentes genes analisados. Diferentemente dos resultados obtidos pelo uso tradicional da técnica (Ercolini, 2004 e Deng *et al.*, 2008), os resultados deste trabalho, igualmente aos isolados analisados por Henriques e cols. (2006) contaram com a diferenciação de bandas através do posicionamento das mesmas no gel contendo o gradiente de desnaturação (Fig 3).

Pela a análise dos perfis encontrados por DGGE, 166 (82,1%) apresentaram amplificação na mesma posição do controle (*bla*_{OXA-65}, do isolado IC 9, produtor de β -lactamase do tipo OXA-58) e 36 (17,8%) obtiveram perfil diferente e foram então submetidos ao sequenciamento de seus produtos de PCR. A Tabela 7 mostra as possíveis variantes genéticas encontradas com homologia ao grupo OXA-51. Nesta análise, foram levadas em consideração apenas as maiores homologias encontradas (> 95%).

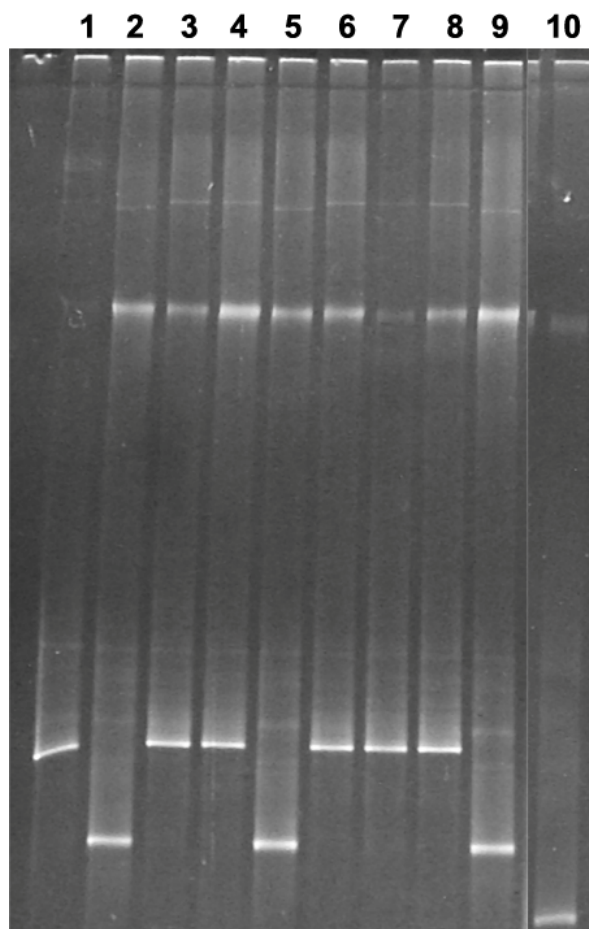


Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de desnaturação (DGGE) variando de 30 a 60%. As colunas de 1 a 10 indicam os isolados IC 9 (*bla*_{OXA-65}), A2, A3, A5, A6, A10, A12, 16, A17 e A74. A banda analisada (com 395pb) possui padrões diferenciados em seu posicionamento, indicando que a sequência de nucleotídeos é distinta do controle.

Dos 36 isolados analisados, dois obtiveram homologia máxima com apenas uma variante genética, o isolado ambiental A30, que mostrou 100% de homologia com a variante OXA-78 e o isolado clínico IC 191, que apresentou homologia de 99% com a variante OXA-89 (variação de apenas dois nucleotídeos, nas posições 569 e 575).

Tabela 7: Perfil de identidade genética à família OXA-51 encontrada em isolados de *Acinetobacter baumannii* selecionados por DGGE.

Perfil	Isolados		Homologia Máxima (%)	Possíveis variantes genéticas encontradas
	Ambientais	Clínicos		
1	A2, A6	IC 119, IC 202, IC 228, IC 250, IC 256	100	OXA-51, OXA-64, OXA-95, OXA-99, OXA-132
2	G12, G20, O1, O3	IC 50, IC 207, IC 208, IC 211, IC 214, IC 273	100	OXA-66, OXA-76, OXA-79
3	G26	-	95	OXA-66, OXA-76, OXA-79
4	-	IC 110, IC 125	99	OXA-51, OXA-64, OXA-71, OXA-89, OXA-95, OXA-98, OXA-99, OXA-111, OXA-132,
5	-	IC 6, IC 38	99	OXA-51, OXA-66, OXA-76, OXA-79, OXA-80, OXA-82, OXA-83, OXA-84, OXA-88, OXA-90, OXA-94, OXA-95, OXA-108, OXA-109, OXA-115, OXA-130, OXA-131
6	A17	IC 85	99	OXA-51, OXA-64, OXA-95, OXA-99, OXA-111, OXA-132,
7	-	IC 104	97	OXA-51, OXA-64, OXA-66, OXA-67, OXA-70, OXA-71, OXA-76, OXA-79, OXA-80, OXA-82, OXA-83, OXA-86, OXA-87, OXA-88, OXA-89, OXA-90, OXA-95, OXA-99, OXA-106, OXA-109, OXA-111, OXA-116, OXA-130, OXA-131, OXA-132
8	-	IC 44	98	OXA-51, OXA-66, OXA-76, OXA-79, OXA-80, OXA-82, OXA-83, OXA-88, OXA-90, OXA-94, OXA-95, OXA-109, OXA-130, OXA-131,
9	-	IC 49	93	OXA-51, OXA-64, OXA-66, OXA-67, OXA-76, OXA-79, OXA-80, OXA-83, OXA-86, OXA-87, OXA-88, OXA-94, OXA-95, OXA-99, OXA-109, OXA-131, OXA-132
10	-	IC 77	95	OXA-51, OXA-64, OXA-66, OXA-67, OXA-71, OXA-76, OXA-79, OXA-80, OXA-82, OXA-83, OXA-86, OXA-87, OXA-88, OXA-94, OXA-95, OXA-99, OXA-109, OXA-111, OXA-113, OXA-115, OXA-116, OXA-131, OXA-132
11	A74, M33	-	99	OXA-68, OXA-77, OXA-78, OXA-89, OXA-91, OXA-98, OXA-116, OXA-117
12	-	IC 270	99	OXA-51, OXA-64, OXA-95, OXA-99, OXA-111, OXA-113, OXA-132

Tabela 8 - continuação

Perfil	Isolados ambientais	Isolados clínicos	Homologia Máxima (%)	Possíveis variantes genéticas encontradas
13	-	IC 277	99	OXA-51, OXA-64, OXA-95, OXA-99, OXA-111, OXA-132
14	O57	-	97	OXA-51, OXA-64, OXA-91, OXA-95, OXA-98, OXA-99, OXA-132
15	M13	-	100	OXA-68, OXA-117
16	-	IC 191	99	OXA-89
17	A30	-	100	OXA-78

A variante OXA-78 foi descrita primeiramente em um isolado clínico escocês, em 2004 (a sequência está depositada no GenBank com o número de acesso AY862132) e possui 39,2% de CG em seu conteúdo genético (Poirel *et al.*, 2010). Já a variante OXA-89 foi primeiramente descrita em estudo realizado no Paraguai, em 2006, que visou estudar a diversidade entre o grupo OXA-51 em isolados clínicos argentinos de *Acinetobacter baumannii*, coletados no período de 1982 a 2005. Neste estudo, dos 30 isolados analisados, foram encontradas sete alelos diferentes (bla_{OXA-51} , bla_{OXA-65} , bla_{OXA-66} , bla_{OXA-69} , bla_{OXA-77} , bla_{OXA-78} e bla_{OXA-89}), concordando com nossos resultados, uma vez que as análises realizadas apontam para uma grande variedade genética no grupo OXA-51 (Merkier e Centrón, 2006).

Embora os resultados deste trabalho apontem para uma ampla variedade de alelos encontrados (Tabela7), a frequência do alelo OXA-65 foi superior as demais (82,6% em isolados ambientais e 81,8% em isolados clínicos), mostrando que este parece ser o alelo mais disseminado entre esses isolados. Este alelo parece ser frequente em isolados de *Acinetobacter*

baumannii na América Latina, pois, logo após ser descoberto em isolados argentinos é frequentemente encontrado em outros locais desta região geográfica (Brown e Amyes, 2005, Merkier e Centrón, 2006 e Ikonomidis *et al.*, 2007). Porém ainda são poucos os estudos realizados nesse sentido, de modo que as análises de distribuição epidemiológica das variantes de OXA-51 ficam prejudicadas (Evans *et al.*, 2007 e 2008).

Contrariando o esperado, a variação de alelos encontrada foi constante para os dois tipos de isolados (aproximadamente 18%), não havendo diferença entre isolados clínicos e ambientais. Pelo ambiente atuar como reservatório de genes de resistência e sofrer uma pressão seletiva menor que isolados clínicos, era esperado que houvesse uma maior variação de alelos nestes isolados do que aos encontrados em isolados clínicos (Yang *et al.*, 2009), porém, os resultados deste trabalho indicam que esta variação independe da origem do isolado e ainda, mostra que os isolados clínicos obtiveram homologia com maior número de alelos do que os isolados ambientais.

A Figura 4 mostra que a relação encontrada entre os isolados sequenciados em nosso estudo concordam com os grupamentos formados pela Tabela 7. Isto é justificado pelo fato de que isolados com sequências semelhantes, obtidas através da análise filogenética realizada, obtiveram homologia com os mesmos alelos de OXA-51. Esta análise foi realizada fazendo alinhamento dos produtos obtidos pelo sequenciamento e construindo-se um dendograma, onde se pode observar a relação de similaridade entre as

sequências obtidas, como por exemplo, o isolado A30, que apresentou homologia com apenas uma variante (*bla*_{OXA-78}), foi agrupado em conjunto com os isolados M33 e M13, possuindo uma relação de similaridade com as prováveis variantes encontradas para esses dois isolados.

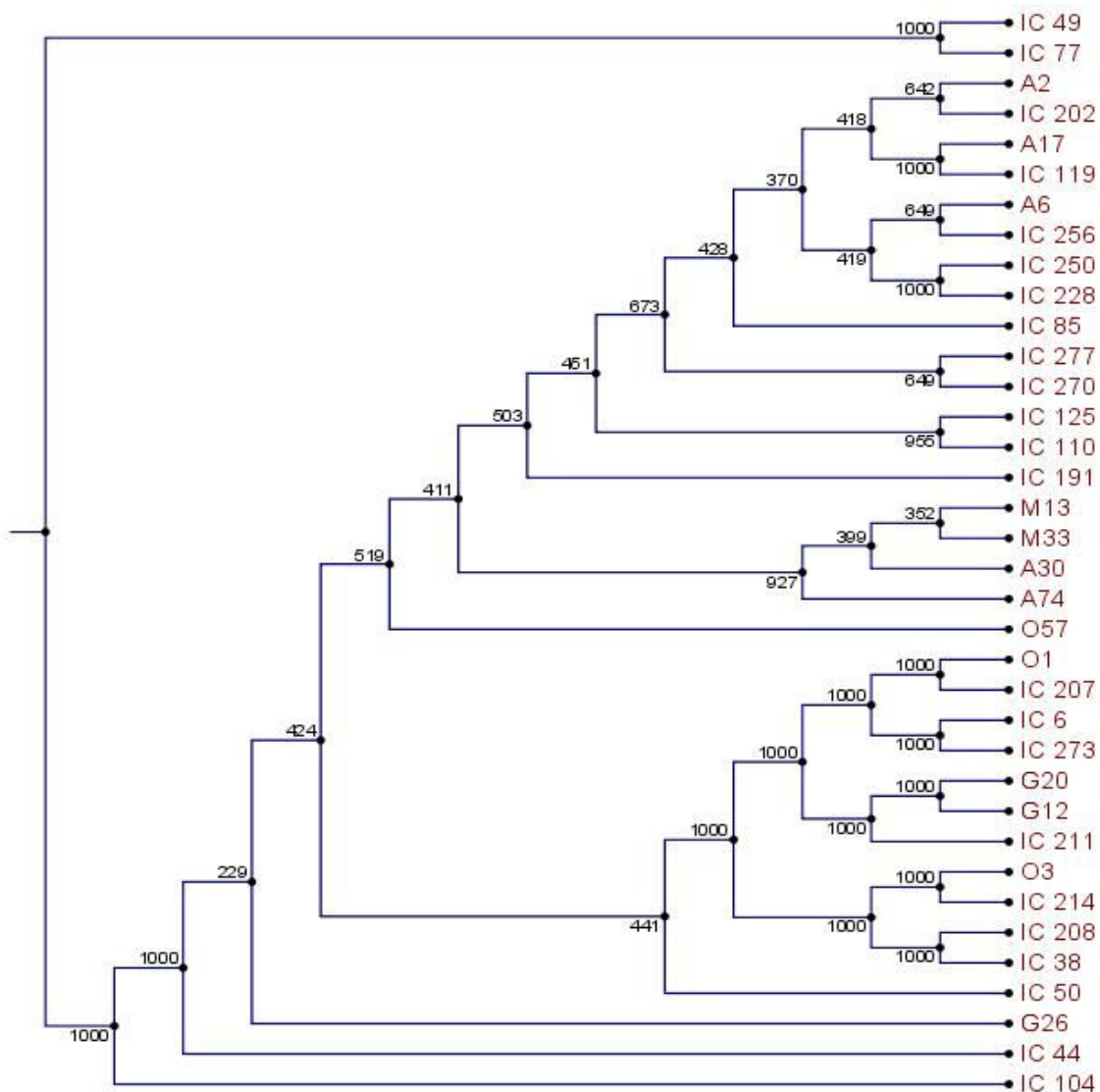


Figura 4: Relação filogenética construída através de alinhamento das sequências dos genes *bla*_{OXA-51-like} analisados. O método algorítmico utilizado foi UPGMA, com análise de Bootstrap de 1000 vezes.

Contudo, os resultados obtidos neste estudo confirmam os dados descritos na literatura, que afirmam que o grupo OXA-51 parece ser muito

homogêneo uma vez que suas variantes possuem poucas substituições de nucleotídeos entre si (Brown e Amyes, 2005 e Koh *et al.*, 2007).

De modo geral, os resultados deste trabalho corroboram com estudos anteriormente realizados mostrando que a sequência de inserção IS*Aba1* é frequente em isolados de *Acinetobacter* sp., principalmente na espécie *Acinetobacter baumannii* e está associada com o aumento da resistência aos carbapenêmicos quando encontrada anteriormente a genes que codificam alelos *bla*_{OXA-51} (Segal *et al.*, 2005). Este estudo mostrou também que esta associação esteve presente em isolados com susceptibilidade diminuída e até mesmo em isolados sensíveis, o que preocupa, pois mostra essas cepas como reservatórios de genes de resistência, que podem ser transferidos, uma vez que são flanqueados por sequências de inserção que tem a característica de serem elementos móveis transponíveis (Mugnier *et al.*, 2009).

A distribuição alélica do grupo OXA-51 é de extrema importância epidemiológica e, os resultados obtidos mostram que esta é uma família que mesmo contando com mais de 40 variantes, há predomínio de certos alelos em regiões geográficas distintas (Koh *et al.*, 2007 e Feizabadi *et al.*, 2008). Neste trabalho, podemos observar que, assim como em outros isolados da América Latina, houve um predomínio do alelo *bla*_{OXA-65}, indicando que esta parece ser a variante dominante nesta região (Brown e Amyes, 2005, Merkier e Centrón, 2006 e Ikonomidis *et al.*, 2007).

5. CONCLUSÕES

A análise de isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter* sp. realizada neste estudo teve por objetivo pesquisar genes de carbapenemases do tipo OXA e IS*Aba1*, bem como sua associação genética. Desse modo, conclui-se que, IS*Aba1* é um elemento frequentemente encontrado, porém sua associação com OXA-51 teve percentuais baixos, tanto em isolados clínicos como em isolados ambientais, de modo que a multirresistência encontrada nos isolados sem essa associação deve ser explicada por outros mecanismos que conferem resistência a antimicrobianos.

Pela primeira vez no Brasil foi descrito um isolado com a presença de *bla*_{OXA-58}. Este resultado inédito mostra a disseminação dessa variante genética ao longo dos anos por todo o mundo. Este dado corroborou com estudos realizados em países vizinhos, como Argentina, Colômbia e Venezuela onde esta variante é muito disseminada e responsável pela resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Acinetobacter baumannii*. No isolado deste estudo, foi encontrada associação positiva entre IS*Aba1* e os genes *bla*_{OXA-65} e *bla*_{OXA-58} o que justificou a multirresistência descrita.

A análise da diversidade do grupo OXA-51 mostrou que a técnica de DGGE é uma boa alternativa para a detecção de diferentes variantes genéticas, pois foi capaz de discriminar diferentes sequências analisadas.

Nossos resultados concluem que a variante OXA-65 é a mais disseminada entre os isolados analisados, mostrando que este alelo parece ser o predominante nesta região da América Latina. A frequência do aparecimento de outros alelos foi baixa e similar entre os isolados clínicos e ambientais, mostrando que existe uma pequena diversidade de alelos presentes nos isolados deste estudo.

Contudo, os resultados nos mostram que o ambiente analisado (esgoto hospitalar) constitui-se de uma fonte de dispersão de bactérias multirresistentes que albergam genes de resistência a antimicrobianos. Sistemas de tratamento de esgoto hospitalar se fazem necessários, pois podem reduzir o lançamento desse tipo de patógeno nos corpos hídricos, diminuindo dessa maneira contaminação ambiental.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos complementares que visem justificar a resistência antimicrobiana nos isolados em que a associação IS*Aba1*/OXA-51 não foi confirmada devem ser realizados, como a pesquisa de bombas de efluxo, de perda de porinas e de outras enzimas com atividade de resistência a antimicrobianos, através de análises fenotípicas e genotípicas, bem como sua expressão em níveis genéticos.

A complementação da análise de diversidade será realizada com o sequenciamento da fase aberta de leitura (ORF) total de *bla*_{OXA-51} dos isolados selecionados pelo seu perfil de DGGE, através da utilização dos oligonucleotídeos iniciadores OXA-51-like-all e subsequente depósito das sequências encontradas no GenBank, finalizando com a análise filogenética dos isolados em estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBO, A.; NAVON-VENEZIA, S.; HAMMER-MUNTZ, O.; KRICHALI, T.; SIEGMAN-IGRA, Y.; CARMELI, Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis**, v.11, n.1, p.22-29, 2005.

AMBLER, R.P. The structure of β -lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.289, n.1036, p.321-331, 1980.

BAUMANN P.; DOUDOROFF M.; STANIER R.Y. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). **J Bacteriol**, v.95, n.5, p.1520-1541, 1968.

BERGOGNE-BEREZIN, 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.

BONOMO, R.A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis**, v.43, n.2, p.49-56, 2006.

BOUVET, P.; JEANJEAN, S. Delineation of new proteolytic genospecies in The Genus *Acinetobacter*. **Res Microbiol**, v.140, n.4-5, p. 291-299, 1989.

BRATU, S.; LANDMAN, D.; MARTIN, D.A.; GEORGESCU, C.; QUALE, J. Correlation of antimicrobial resistance with beta-lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.9, p.2999-3005, 2008.

BRISOU, J.; PREVOT, A.R. Etudes de systematique bacterienne. X. Revision des especes reunies dans le genre *Achromobacter*. **Ann Inst Pasteur**, v. 86, n.6, p.722-728, 1954.

BROWN, S.; AMYES, S. OXA β -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. **J Antimicrob Chemother**, v.57, n.1, p.1-3, 2006.

BROWN, S.; AMYES, S.G.B. The sequences of seven class D β -lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. **Clin Microbiol Infect**, v.11, n.4, p.326-329, 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. 9, n.6, p.1211-1233, 1995.

CARR, E.; KÄMPFER, P.; PATEL, B.K.; GÜRTLER, V.; SEVIOUR, R.J. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.53, n.4, p.953-963, 2003.

CARVALHO, K.R.; CARVALHO-ASSEF, A.P.; PEIRANO, G.; SANTOS, L.C.; PEREIRA, M.J.; ASENSI, M.D. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro. **Int J Antimicrob Agents**, v.34, n.1, p.25-28, 2009.

CHANG, H.C.; WEI, Y.F.; DIJKSHOORN, L.; VANEECHOUTTE, M.; TANG, C.T.; CHANG T.C. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. **J Clin Microbiol**, v.43, n.4, p.1632-1639, 2005.

CHEN, T.L.; WU, R.C.; SHAIQ, M.F.; FUNG, C.P.; CHO, W.L. Acquisition of a plasmid-borne *bla*_{OXA-58} gene with an upstream IS1008 insertion conferring a high level of carbapenem resistance to *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.7, p.2573-80, 2008.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement M100-S20**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.

COELHO, J.; WOODFORD, N.; AFZAL-SHAH, M.; LIVERMORE, D. M. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n.2, p.756-758, 2006.

COELHO, J.; WOODFORD, N.; TURTON, J.; LIVERMORE, D.M. Multiresistant *Acinetobacter* in the UK: how big a threat? **J Hosp Infect**, v.58, n.3, p.167-169, 2004.

DALLA-COSTA, L. M.; COELHO, J. M.; SOUZA, H. A.; CASTRO, M. E.; STIER, C. J.; BRAGAGNOLO, K. L.; REA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S. R.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. 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.

DENG, W.; XI, D.; MAO, H.; WANAPAT, M. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. **Mol Biol Rep**, v.35, n.2, p.265-274, 2008.

DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. **Clin Infect Dis**, v.45, n.1, p.88-94, 2007.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **J Microbiol Methods**, v.56, n.3, p.297-314, 2004.

EVANS, B.A.; BROWN, S.; HAMOUDA, A.; FINDLAY, J.; AMYES, S.G. Eleven novel OXA-51-like enzymes from clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect**, v.13, n.11, p.1137-1138, 2007.

EVANS, B.A.; HAMOUDA, A.; TOWNER, K.J.; AMYES, S.G. OXA-51-like β -lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect**, v.14, n.3, p.268-275, 2008.

FEIZABADI, M.M.; FATHOLLAHZADEH, B.; TAHERIKALANI, M.; RASOOLINEJAD, M.; SADEGHIFARD, N.; ALIGHOLI, M.; SOROUSH, S.; MOHAMMADI-YEGANE, S. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of *bla*_{OXA} genes among *Acinetobacter* spp. isolated from patients at Tehran hospitals. **Jpn J Infect Dis**, v.61, n.4, p.274-278, 2008.

FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; CONEJO, M.C.; AYALA, J.A.; PEREA, E.J.; PASCUAL A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.51, n.3, p.565-574, 2003.

FERREIRA, A.E. **Caracterização molecular e detecção de genes de resistência em isolados de *Acinetobacter* sp. de amostras clínicas e de efluente hospitalar. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FERREIRA, A.E.; CUNHA, G.R.; FUENTEFRIA, D.B.; CORÇÃO, G. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em cepas de *Acinetobacter* spp isoladas de efluente hospitalar em Porto Alegre-RS. **Cad Farm**, v.23, n.1, p.9-14, 2007.

FIGUEIREDO, S.; POIREL, L.; PAPA, A.; KOULOURIDA, V.; NORDMANN, P. Overexpression of the naturally occurring *bla*_{OXA-51} gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence IS*Aba9*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.9, p.4045-4047, 2009.

GARRITY, M.; BRENNER, D.J.; KRIEG N.J.; STALEY, J.T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 2, The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria**, 2 ed. Springer 2005.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. First isolation of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.1, p.578-579, 2010.

GORDON, N.C.; WAREHAM, D.W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **Int J Antimicrob Agents**, v.35, n.3, p.219-226, 2010.

GREEN S.J. **Don't panic: a guide to denaturing gradient gel electrophoresis**, v.2, p.1-32, 2005.

GUSATTI, C.S.; FERREIRA, A.E.; FUENTEFRIA, D.B.; CORÇÃO, G. Resistência a β-lactâmicos em *Acinetobacter* spp isolados de efluente hospitalar no sul do Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.42, n.2, p.183-187, 2009.

HAMOUDA, A.; AMYES, S.G. Development of highly ciprofloxacin-resistant laboratory mutants of *Acinetobacter baumannii* lacking topoisomerase IV gene mutations. **J Antimicrob Chemother**, v.57, n.1, p.155-156, 2006.

HANLON, G. The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. **Lett Appl Microbiol**, v.41, n.5, p.375-378, 2005.

HENRIQUES, I.; MOURA, A.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M.J.; CORREIA, A. Analysing diversity among β -lactamase encoding genes in aquatic environments. **FEMS Microbiol Ecol**, v.56, n.3, p.418-429, 2006.

HÉRITIER, C.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of IS*Aba1* in *Acinetobacter baumannii*. **Clin Microbiol Infect**, v.12, n.2, p.123-130, 2006.

HIGGINS, P.G.; DAMMHAYN, C.; HACKEL, M.; SEIFERT, H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.65, n.2, p.233–238, 2010.

HIGGINS, P.G.; POIREL, L.; LEHMANN, M.; NORDMANN, P.; SEIFERT, H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.12, p.5035-5038, 2009.

IKONOMIDIS, A.; POURNARAS, S.; MARKOGIANNAKIS, A.; MANIATIS, A.N.; MANOLIS, E.N.; TSAKRIS A. Low genetic diversity of the intrinsic OXA-51-like class D carbapenemases among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece. **Epidemiol Infect**, v.135, n.5, p.877-881, 2007.

JANSSEN, P.; MAQUELIN, K.; COOPMAN, R.; TJERNBERG, I.; BOUVET, P.; KERSTERS, K.; DIJKSHOORN, L. Discrimination of *Acinetobacter* Genomic Species by AFLP Fingerprinting. **Int J Syst Bacteriol**, v.47, n.4, p.1179-1187, 1997.

JAWAD, A.; SEIFERT, H.; SNELLING, A.M.; HERITAGE, J.; HAWKEY, P.M. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. **J Clin Microbiol**, v.36, n.7, p.1938-1941, 1998.

KARLOWSKY, J.A.; DRAGHI, D.C.; JONES, M.E.; THORNSBERRY, C.; FRIEDLAND, I.R.; SAHM, D.F. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998-2001. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, n.5, p.1681-1688, 2003.

KOH, T.H.; SNG, L.H.; WANG, G.C.; HSU, L.Y.; ZHAO, Y. IMP-4 and OXA β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. **J Antimicrob Chemother**, v.59, n.4, p.627-632, 2007.

LEE, K.; KIM, M.N.; CHOI, T.Y.; CHO, S.E.; LEE, S.; WHANG, D.H.; YONG, D.; CHONG, Y.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M.; KONSAR GROUP. Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. **Int J Antimicrob Agents**, v.33, n.6, p.520-524, 2009.

LEE, Y.; YUM, J.H.; KIM, C.K.; YONG, D.; JEON, E.H.; JEONG, S.H.; AHN, J.Y.; LEE, K. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the *bla*_{OXA-66} gene. **Annals Clin Laborat Sci**, v.40, n.1, p.43-48, 2010.

LOOVEREN, M.VAN; GOOSSENS, H.; ARPAC STEERING GROUP. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v.10, n.8, p.684-704, 2004.

MARAGAKIS, L.L.; PERL, T.M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clin Infect Dis**, v.46, n.8, p.1254-1263, 2008.

MARTI, S.; SANCHEZ-CESPEDES, J.; BLASCO, M.D.; RUIZ, M.; ESPINAL, P.; ALBA, V.; FERNANDEZ-CUENCA, F.; PASCUAL, A.; VILA, J. Characterization of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in an *Acinetobacter* genospecies 3 clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.8, p.2955-2958, 2008.

MARTINS, A.F.; KUCHENBECKER, R.; SUKIENNIK, T.; BOFF, R.; REITER, K.C.; LUTZ, L.; MACHADO, A.B.M.P.; BARTH, A.L. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme. **Infection**, v.37 n.5, p.474-476, 2009.

MERKIER, A.K.; CATALANO, M.; RAMÍREZ, M.S.; QUIROGA, C.; ORMAN, B.; RATIER, L.; FAMIGLIETTI, A.; VAY, C.; DI MARTINO, A.; KAUFMAN, S.; CENTRÓN, D. Polyclonal spread of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. **J Infect Dev Ctries**, v.2, n.3, p.235-240, 2008.

MERKIER, A.K.; CENTRÓN, D. *bla*_{OXA-51}-type-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents**. v.28, n.2, p.110-113, 2006.

MISBAH, S.; HASSAN, H.; YUSOF, M.Y.; HANIFAH, Y.A.; ABUBAKAR, S. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. **Singapore Med J**, v.46, n.9, p.461-464, 2005.

MUGNIER, P.D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Functional analysis of insertion sequence *ISAb₁*, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. **J Bacteriol**, v.191, n.7, p.2414-2418, 2009.

OLANIRAN, A.O.; STAFFORD, W.H.; COWAN, D.A.; PILLAY, D.; PILLAY, B. Microbial community profiling in cis- and trans-dichloroethene enrichment systems using denaturing gradient gel electrophoresis. **J Microbiol Biotechnol**, v.17, n.4, p.560-570, 2007.

PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev**, v.18, n.4, p.657-686, 2005.

PATON, R.; MILES, R.S.; HOOD, J.; AMYES, S.G.B. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents**, v.2, n.2, p.81-87, 1993.

PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev**, v.21, n.3, p.538-582, 2008.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **Int J Med Microbiol**, v.300, n.6, p.371-379, 2010.

POIREL, L.; LEBESSI, E.; HÉRITIER, C.; PATSOURA, A.; FOUSTOUKOU, M.; NORDMANN, P. Nosocomial spread of OXA-58-positive

carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. **Clin Microbiol Infect**, v.12, p.11, p.1138-1141, 2006.

POIREL, L.; MANSOUR, W.; BOUALLEGUE, O.; NORDMANN, P. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.5, p.1613-1617, 2008.

POIREL, L.; MARQUÉ, S.; HÉRITIER, C.; SEGONDS, C.; CHABANON, G.; NORDMANN, P. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.1, p.202-208, 2005.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.1, p.24-38, 2010.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clin Microbiol Infect**, v.12, n.9, p.826–836, 2006 (a).

POIREL, L.; NORDMANN, P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n.4, p.1442-1448, 2006 (b).

POURNARAS, S.; MARKOGIANNAKIS, A.; IKONOMIDIS, A.; KONDYLI, L.; BETHIMOUTI, K.; MANIATIS, A. N.; LEGAKIS, N. J.; TSAKRIS, A. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. **J Antimicrob Chemother**, v.57, n.3, p.557-561, 2006.

QI, C.; MALCZYNSKI, M.; PARKER, M.; SCHEETZ, M.H. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. **J Clin Microbiol**, v.46, n.3, p.1106-1109, 2008.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v.20, n.3, p.440-458, 2007.

SALAZAR DE VEGAS, E.Z.; NIEVESM, B.; RUIZ, M.; RUÍZ, J.; VILA, J.; MARÍA, A.; ELSA, V. Molecular epidemiology and characterization of resistance mechanisms to various antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii* isolated in Mérida, Venezuela. **Med Sci Monit**, v.13, n.4, p.89-94, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning – a laboratory manual**, 2^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCAIFE, W.; YOUNG, H.; PATON, R.H.; AMYES, S.G.B. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source **J Antimicrob Chemother**, v.36, n.3, p.585-586, 1995.

SEGAL, H.; GARNY, S.; ELISHA, B.G. Is IS*Aba1* customized for *Acinetobacter*? **FEMS Microbiol Lett**, v.243, n.2, p.425-429, 2005.

SEGAL, H.; JACOBSON, R.K.; GARNY, S.; BAMFORD, C.M.; ELISHA, B.G. Extended -10 promoter in IS*Aba-1* upstream of *bla*_{OXA-23} from *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.8, p.3040-3041, 2007.

TAKAGI, E.H., N. LINCOPAN, V.C. CASSETTARI, L.F. PASSADORE, E.M. MAMIZUKA, AND M.B. MARTINEZ. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak at university hospital. **Braz J Microbiol**, v.40, n.2, p.339-341, 2009.

TENNSTEDT, T.; SZCZEPANOWSKI, R.; BRAUN S.; PÜHLER, A.; SCHLÜTER, A. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, v.45, n.3, p.239-252, 2003.

TJERNBERG, L.; URSING, J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA–DNA hybridization. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand**, v.97, n.7, p. 596–605, 1989.

TURTON, J.F.; WARD, M.E.; WOODFORD, N.; KAUFMANN, M. E.; PIKE, R.; LIVERMORE, D.M.; PITT, T.L. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol Lett**, v.258, n.1, p.72-77, 2006 (a).

TURTON, J.F.; WOODFORD, N.; GLOVER, J.; YARDE, S.; KAUFMANN, M.E.; PITT, T.L. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. **J Clin Microbiol**, v.44, n.8, p.2974-2976, 2006 (b).

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v.57, n.3, p.373-383, 2006.

WANG, H.; GUO, P.; SUN, H.; WANG, H.; YANG, Q.; CHEN, M.; XU, Y.; ZHU, Y. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.11, p.4022-4028, 2007.

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M.J.; COELHO, J.M.; TURTON, J.F.; WARD, M.E.; BROWN, S.; AMYES, S.G.; LIVERMORE, D.M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **Int J Antimicrob Agents**, v.27, n.4, p.351-353, 2006.

YANG, C.M.; LIN, M.F.; LIAO, P.C.; YEH, H.W.; CHANG, B.V.; TANG, T.K.; CHENG, C.; SUNG, C.H.; LIOU, M.L. Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. **Lett Appl Microbiol**, v.48, n.5, p.560-565, 2009.

ZHANG, Y.; MARRS, C.F.; SIMON, C.; XI, C. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. **Sci Total Environ**, v.407, n.12, p.3702-3706, 2009.

9. ANEXOS

9.1 Anexo 1: Relação de reagentes e soluções utilizadas

Diluição de oligonucleotídeos iniciadores

Todos os oligonucleotídeos iniciadores foram diluídos inicialmente em 100µL de água deonizada esterilizada. As soluções de uso foram 1µM, que foram calculadas a partir da molaridade da solução-mãe:

Tabela 8: Soluções de uso para os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo.

Oligonucleotídeo iniciador (concentração inicial)	Quantidade utilizada da solução mãe (µL)	Quantidade de água utilizada (µL)
OXA-24 A (360 µM)	1,38	498,6
OXA-24 B (259 µM)	1,93	498,07
OXA-58 A (300 µM)	1,66	498,34
OXA-58 B (328 µM)	1,52	498,48
ISAbA 1 F (298 µM)	1,67	498,33
ISAbA 1 R (447 µM)	1,11	498,89
OXA-51 A (285 µM)	1,75	498,25
OXA-51 B (247 µM)	2	498
OXA-51-like-all F (405 µM)	1,25	498,75
OXA 51-like-all R (399 µM)	1,23	498,77
OXA-51 DGGE (745 µM)	1,07	798,93*
Acin16S F (227 µM)	2,2	497,8
Acin16S R (343 µM)	1,45	498,55

* Todas as soluções foram preparadas em um volume final de 500 µL, exceto a solução de OXA-51 DGGE, em que o volume final foi de 800 µL.

Formamida deonizada

Utiliza-se 1g de amberlite IRA 120 (resina catiônica) para cada 20 mL de formamida. Misturar a resina no líquido e permanecer em agitador magnético por 1h, após fazer a filtração em papel filtro, e congelar o filtrado ao abrigo da luz.

Mix de DNTP's (10mM)

A solução comercial é de 100 mM, para preparar uma solução de 10 mM, mistura-se 10µL de cada tipo de dNTP (adenina, citosina, guanina e timina) com 60 µL de água deonizada esterilizada, formando uma solução final de 100µL na concentração de 10 mM.

NaCl (5M)

Pesar 292,5g de NaCl e dissolver em 1000 mL de água destilada. Depois de dissolvido, esterilizar por autoclavação (121°C por 10 min, 1 ATM). Manter a temperatura ambiente.

SDS 20%

Pesar 20g do pó para cada 100 mL de água destilada. Esterilizar por autoclavação (121°C por 10 min, 1 ATM). Manter a temperatura ambiente.

Solução clorofórmio- álcool isomilico (24:1)

Misturar 24 mL de clorofórmio para cada 1 mL de álcool isoamílico. Uso imediato.

Solução de persulfato de amônio (APS) 10%

Pesar 1g de pó para cada 100mL de água deonizada esterilizada. Fazer alíquotas de volume de uso e congelar a - 20°C.

OBS: Produto tóxico, usar EPIs.

Solução de Brometo de Etídeo

Fazer solução estoque na concentração de 10 mg/mL, para tanto, pesar 10 mg e dissolver em 1 mL de água deionizada esterilizada. Manter sob refrigeração a 4°C. Para fazer a solução de uso utilizada em banhos de brometo, utilizar a concentração de uso de 0,5 µg/mL. Para fazer 100 mL dessa solução deve-se diluir em tampão de uso, 5µL da solução estoque.

OBS.: Substância mutagênica, usar EPIs.

Solução de Lisozima (20mg/ml)

Pesar 20 mg do pó liofilizado e dissolver em 1 mL de água deionizada esterilizada. Manter congelado a -20°C.

Solução de Poliacrilamida 0% Desnaturante

Para fazer 50mL, misturar 12,5 mL de solução de poliacrilamida 40%, 1mL de TAE 50X, 1mL de glicerol e 35,5 mL de água deionizada esterilizada. Agitar bem e manter sob refrigeração, ao abrigo da luz, por no máximo 30 dias.

OBS.: Produto tóxico, usar EPIs

Solução de Poliacrilamida 100 % Desnaturante

Para fazer 50 mL, pesar 21g de uréia e misturar com 12,5 mL de solução de poliacrilamida 40%, 20 mL de formamida deionizada, 1 mL de TAE 50X, 1 mL de glicerol. Completar os 50 mL com água deionizada esterilizada. Aquecer em banho térmico 50°C até dissolver a uréia. Agitar bem e manter sob refrigeração, ao abrigo da luz, por no máximo 30 dias.

OBS.: Produto tóxico, usar EPIs

Solução de Poliacrilamida 40%

Pesar 37,5g de acrilamida e 1g de bis-acrilamida e dissolver em 100 mL de água deionizada esterilizada. A dissolução só acontece em banho térmico de 50°C. Armazenar em frasco protegidos da luz sob refrigeração.

OBS.: Produto tóxico, usar EPIs

Solução High (60% de desnaturante)

Em um volume de 20 mL, misturar 12 mL da Solução de Poliacrilamida 100% Desnaturante com 8 mL da Solução de Poliacrilamida 0% Desnaturante. Agitar e manter ao abrigo da luz. Uso imediato.

OBS.: produto tóxico, usar EPIs.

Solução Low (30% de desnaturante)

Em um volume de 20 mL, misturar 6 mL da Solução de Poliacrilamida 100% Desnaturante com 14 mL da Solução de Poliacrilamida 0% Desnaturante. Agitar e manter ao abrigo da luz. Uso imediato

OBS.: produto tóxico, usar EPIs.

Solução de Proteinase K (20mg/mL)

Pesar 20mg do pó liofilizado e dissolver em 1 mL de água deionizada esterilizada. Manter congelado a -20°C.

Tris-HCl (1M, pH=8,0)

Pesar 121,14 g de Tris-base e dissolver em 1000 mL de água destilada. Ajustar o pH com solução de HCl 1N. Esterilizar por autoclavação (121°C por 10 min, 1 ATM). Armazenar em temperatura ambiente.

EDTA (0,5M, pH=8,0)

Pesar 186,12 g de EDTA e dissolver em 1000 mL de água destilada. Ajustar o pH com solução de NaOH 1M. Esterilizar por autoclavação (121°C por 10 min, 1 ATM). Armazenar em temperatura ambiente.

TAE 1X

Para fazer 1000 mL, diluir 20 mL de TAE 50X em 980 mL de água destilada.

TAE 50X

Pesar 242g de Tris base e dissolver em 57,1mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA (0,5 M, pH=8,0) e completar para 1000mL de água destilada.

Tampão de corrida (6X)

Para fazer 100 mL, pesar 0,5 g de azul de bromofenol e misturar a 30 mL de glicerol e 70 mL de água destilada. Ajustar o pH com NaOH (1M) até obter uma coloração azul escura. Armazenar a -20°C.

TE1 (10mM de Tris-HCl, 25mM de EDTA, pH=8,0)

Para fazer 1000 mL, misturar 10mL de Tris-HCl (1M pH=8,0), 50 mL de EDTA (0,5M pH=8,0) e 940mL de água destilada esterilizada. Manter em temperatura ambiente.

TE2 (10mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA, pH=8,0)

Para fazer 1000 mL, misturar 10 mL de Tris-HCl (1M pH=8,0), 2 mL de EDTA (0,5M pH=8,0) e 988mL de água destilada esterilizada. Manter em temperatura ambiente.

TES (10mM de Tris-HCl, 25mM de EDTA, pH=8,0, 150mM de NaCl)

Para fazer 1000 mL, misturar 10 mL de Tris-HCl (1M pH=8,0), 50 mL de EDTA (0,5M pH=8,0), 7,5 mL de NaCl (5M) e 932,5 mL de água destilada esterilizada. Manter em temperatura ambiente.

Gel de agarose 1%

Pesar 1 g de agarose para cada 100 mL de tampão TAE 1X, dissolver em aquecimento e adicionar 5 μ L de solução de brometo de etídio na concentração de 10mg/mL. Deixar solidificar formando um gel. Uso imediato.

OBS.: contém substâncias mutagênicas, usar EPIs.

9.2 Anexo 2: Alinhamento de alelos do tipo *bla*_{OXA-51-like}

utilizados para na Técnica de DGGE

