

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

DETECÇÃO DO GENE *bla*_{OXA-23} POR PCR EM TEMPO REAL DE ASPIRADOS
TRAQUEAIS DE PACIENTES SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA

Flávia Brust

Porto Alegre

2012

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

DETECÇÃO DO GENE *bla*_{OXA-23} POR PCR EM TEMPO REAL DE ASPIRADOS
TRAQUEAIS DE PACIENTES SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA

Flávia Brust

Orientador: Dr. Alexandre Prehn Zavascki
Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Mestre

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Brust, Flávia

Detecção do gene bla OXA-23 por PCR em tempo real de aspirados traqueais de pacientes sob ventilação mecânica / Flávia Brust. -- 2012.
59 f.

Orientador: Alexandre Prehn Zavascki.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Microbiologia. 2. Resistência bacteriana. 3. Acinetobacter baumannii. 4. PCR em tempo real. 5. Gene bla OXA-23. I. Prehn Zavascki, Alexandre, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

A Deus, minha família, amigos e orientadores pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder tantas coisas maravilhosas e por me dar força para superar as dificuldades.

Aos meus pais por sempre terem me incentivado a lutar pelos meus sonhos e objetivos e por me ensinarem os verdadeiros valores da vida. Enfim, não existem palavras para descrever o amor, orgulho e gratidão que sinto por vocês!

Ao meu irmão e minha cunhada pelo carinho, cuidado, incentivo e inúmeros conselhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki pela atenção, sabedoria, apoio e empenho. Obrigada pela oportunidade de trabalhar e aprender com você.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Vlademir Cantarelli por tornar a Biologia Molecular algo muito mais compreensível e pela calma e incentivo nos momentos mais complicados.

Aos meus amigos e colegas de trabalho pela amizade, paciência e carinho.

A todas as pessoas da Universidade Feevale, Laboratório de Microbiologia da PUC, Laboratório Weinmann, Laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa, LACEN, UFCSPA e HCPA, que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa dissertação de Mestrado.

O mundo é como um espelho que devolve a cada pessoa o reflexo de seus próprios pensamentos. A maneira como você encara a vida é que faz toda diferença.

Luís Fernando Veríssimo

RESUMO

Introdução: O gênero *Acinetobacter* representa um importante patógeno relacionado a infecções hospitalares, principalmente, à pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV). O aumento de isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (ABRC) representa um problema mundial, pois limita drasticamente as opções terapêuticas. A produção da carbapenamase OXA-23, uma β -lactamase da classe D de Ambler, representa o principal mecanismo responsável por esta resistência em nosso país.

Objetivo: O presente estudo tem como objetivo padronizar a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a detecção do gene *bla*_{OXA-23} diretamente de aspirados traqueais (ATs) de pacientes com suspeita de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) de unidades de tratamento intensivo (UTIs).

Métodos e resultados: O DNA das amostras de ATs coletadas de pacientes em ventilação mecânica foi analisado pela técnica de qPCR, utilizando o *SYBR green*, para a detecção do gene *bla*_{OXA-23}. Dentre os 20 ATs analisados, ABRC foi isolado em 10, *A. baumannii* sensível aos carbapenêmicos (ABSC) em 3 e 7 foram negativos na cultura bacteriológica. O gene *bla*_{OXA-23} foi detectado tanto na colônia quanto no AT em 8 das 10 amostras de ABRC. Em uma amostra não houve detecção do gene por qPCR em nenhum dos materiais e em outra amostra houve detecção só no AT. Dos ABSC, em duas amostras não houve detecção do gene na colônia e no AT enquanto que em uma amostra o gene foi detectado somente no AT. Em nenhuma das amostras de ATs negativas na cultura foi detectado o gene.

Conclusão: O estudo sugere que a técnica qPCR pode ser aplicada para a detecção do gene *bla_{oxa-23}* diretamente de amostras de AT, reduzindo assim, o tempo para o início de uma terapia antimicrobiana adequada e melhorando, conseqüentemente, o desfecho clínico destes pacientes.

Palavras-chave: *A. baumannii*, OXA-23, carbapenemasas, PCR em tempo real, aspirado traqueal, pneumonia.

ABSTRACT

Background: The genus *Acinetobacter* is an important pathogen associated with nosocomial infections mainly ventilator-associated pneumonia (VAP). The increasing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) isolates is a worldwide concern since it limits drastically the range of therapeutic alternatives. The OXA-23 producing, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase, is the major mechanism responsible for CRAB in our country.

Objective: The study objective is to develop a real time PCR (qPCR) to detect the *Acinetobacter baumannii bla*_{OXA-23} gene directly in endotracheal aspirate (ETA) of patients under mechanical ventilation, with suspected ventilator-associated pneumonia (VAP).

Methods and Results: DNA extracted from ETA samples from patients under mechanical ventilation was analyzed by qPCR, using *SYBR green*, for the presence of *bla*_{OXA-23} gene. Among the 20 ETAs examined, CRAB isolates were recovered in 10 quantitative cultures; carbapenem-susceptible *A. baumannii* (CSAB) in 3 and 7 cultures were negative to *A. baumannii*. Of the 10 CRAB, 8 were positive for *bla*_{OXA-23} on both the colony and ETA. In one *bla*_{OXA-23} qPCR was negative in colony and directly from ETA, while the other showed a qPCR negative result in the colony and positive in the ETA. In 3 CSAB, 2 samples showed negative results in colony and ETA and one showed a *bla*_{OXA-23} positive result only from the ETA. None of the 7 negative ETAs were positive for *bla*_{OXA-23} gene in the qPCR of the ETA.

Conclusion: Our study suggests that qPCR can be applied to detect the presence of *bla*_{OXA-23} gene directly from ETAs reducing the time to an earlier initiation of appropriate therapy improving, consequently, the clinical outcomes for these patients.

Keywords: *A. baumannii*, OXA-23, carbapenemases, real time PCR, endotracheal aspirates, pneumonia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva gerada pela reação da PCR em tempo real	29
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABMR	<i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente
ABRC	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos
ABSC	<i>Acinetobacter baumannii</i> sensível aos carbapenêmicos
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphisms</i>
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>
ARI-1	<i>Acinetobacter resistant to imipenem</i>
Complexo Acb	Complexo <i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CT	Cycle threshold
ESBLs	β -lactamases de espectro estendido
<i>FRET</i>	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemases
MLSA	<i>Multilocus Sequence Analysis</i>
NDM-1	Nova Délhi Metalo β -Lactamase
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
PD	Farmacodinâmica
PK	Farmacocinética
qPCR	PCR em tempo real
RND	<i>Resistance Nodulation Division</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 <i>Acinetobacter</i> spp – Microbiologia	14
2.2 Mecanismos de resistência	15
2.3 OXA carbapenemases no mundo e no Brasil	20
2.4 Pneumonia associada à ventilação mecânica	22
2.4.1 Patogênese	22
2.4.2 Morbidade e mortalidade	23
2.4.3 Agentes etiológicos	24
2.4.4 PAV e <i>Acinetobacter</i> spp	24
2.4.5 Diagnóstico	25
2.4.6 Métodos moleculares	27
2.4.7 Tratamento	32
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVO	35
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
6 ARTIGO	45
ANEXO I	60

1 INTRODUÇÃO

O presente estudo pretende estabelecer, com auxílio da técnica de PCR em tempo real (qPCR), um teste diagnóstico para a detecção do gene *bla*_{OXA-23} diretamente do espécime clínico. A OXA-23, enzima codificada por este gene, representa um dos principais mecanismos de resistência das espécies de *Acinetobacter* aos antimicrobianos do grupo dos carbapenêmicos. A grande vantagem da técnica de qPCR é sua capacidade de fornecer, em poucas horas, um resultado de alta sensibilidade e especificidade. O emprego desta metodologia na área da microbiologia permite a detecção de genes de resistência aos antimicrobianos em um intervalo de tempo muito menor quando comparado com o método tradicional, cultura bacteriana, utilizado na rotina de laboratórios clínicos. A cultura necessita de 24-48 horas para a liberação de resultados negativos, podendo este tempo estender-se para 3-4 dias com a confirmação da identificação da espécie e teste de sensibilidade nas amostras positivas. Desta forma, a detecção precoce de um gene codificador de um importante mecanismo de resistência pode diminuir significativamente o tempo entre colheita do espécime clínico e o início da terapia antimicrobiana apropriada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Acinetobacter* spp - Microbiologia

O gênero *Acinetobacter* compreende cocobacilos Gram negativos, aeróbicos, não-fermentadores, imóveis, catalase positivos, oxidase negativos, não fastidiosos.¹ Este microrganismo cresce bem a 37°C em meios de cultura sólidos comumente utilizados em laboratórios clínicos (ágar sangue e MacConkey); as colônias apresentam coloração branca-acinzentada, podendo ser mucóides e medem de 1,5 a 3 mm de diâmetro.²

Acinetobacter foi descrito pela primeira vez em 1911 como *Micrococcus calcoaceticus*. Desde então recebeu diferentes nomes e, em 1950, passou a ser denominado como *Acinetobacter*.³ Em 1986, foi descrito um sistema fenotípico de identificação para espécies de *Acinetobacter*⁴ que juntamente com uma versão simplificada subsequente⁵ se mostrou eficiente para a identificação da maioria das espécies.² De acordo com este sistema proposto, as espécies *Acinetobacter calcoaceticus*, isolada do solo, água e raramente em humanos, *Acinetobacter baumannii*, a espécie mais frequentemente associada a infecções humanas, as genoespécies 3 e 13TU não podem ser classificadas separadamente pois apresentam características fenotípicas muito similares, sendo assim, recebem a denominação de complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (complexo Acb).⁶ Em 2011, após análises genotípicas, as genoespécies 3 e 13TU foram nomeadas como *Acinetobacter pittii* sp. nov. e *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov, respectivamente.⁷ Atualmente, 23 espécies deste gênero já foram identificadas e 11 genoespécies foram delineadas pela técnica de hibridização DNA-DNA.⁷ Em laboratórios de microbiologia, os sistemas comerciais disponíveis não são capazes de

diferenciar os membros do complexo Acb. Alguns métodos genotípicos permitem uma identificação confiável das espécies deste complexo, como ribotipagem, *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA), análise de *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP), análise da sequência da região intergênica 16S-23S rRNA, análise da sequência do gene *rpoB*, *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA).⁷

Os membros do gênero *Acinetobacter* são amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados na água, no solo e em vegetais.⁸ Em humanos podem colonizar a pele, trato respiratório, trato gastrointestinal e feridas.⁹ A capacidade deste microrganismo em sobreviver em diferentes condições ambientais e por um longo período em superfícies inanimadas torna-o um importante patógeno relacionado a surtos hospitalares.^{5,10}

Este microrganismo pode estar envolvido em uma variedade de infecções como infecções de corrente sanguínea, do trato urinário, de feridas, meningite secundária e, principalmente, pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV).^{1,5,9}

2.2 Mecanismos de Resistência

As espécies de *Acinetobacter* possuem altos níveis de resistência seja por mecanismos intrínsecos ou pela aquisição de determinantes genéticos.^{11,12} A resistência intrínseca desses microrganismos pode ser explicada pela diminuição da permeabilidade da membrana externa a determinadas classes de antimicrobianos e pela expressão constitutiva de bombas de efluxo.¹² A aquisição de determinantes genéticos como integrons, transposons e plasmídeos corresponde a mecanismos de resistência adquiridos. Fournier e colaboradores compararam o

genoma de uma cepa de *A. baumannii* multirresistente (ABMR) com uma cepa multisensível e verificaram a presença de uma região de 86 kb contendo 45 genes de resistência na cepa multirresistente.¹³

O número reduzido e o tamanho das porinas podem explicar a diminuição na permeabilidade da membrana externa em *A. baumannii* (inferior a 5%) quando comparada a outras bactérias Gram negativas.¹² A maior porina expressa por esse germe é a HMP-AB, uma proteína análoga a OmpA em *Escherichia coli* e OprF em *Pseudomonas aeruginosa* que permite a passagem dos β -lactâmicos.¹⁴ Outras porinas relacionadas à resistência aos carbapenêmicos são o OprD e a CarO (29kDa).¹² Recentemente, um estudo realizado por Mostachio e colaboradores avaliou a presença de porinas em isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes a carbapenêmicos. As porinas, 29kDa, 33-36kDa e 43kDa, previamente relacionadas com resistência a esta classe de antimicrobianos estavam diminuídas e até mesmo ausentes na maioria dos isolados avaliados.¹⁵

Em bactérias Gram negativas, a membrana externa limita a quantidade de antimicrobianos que entra na célula e as bombas de efluxo exportam ativamente diferentes classes de antimicrobianos para o exterior. Isolados multirresistentes tem sido frequentemente associados à superexpressão desses transportadores. Os antimicrobianos expelidos necessitam atravessar a membrana externa de baixa permeabilidade para penetrar novamente na célula, por consequência, as bombas de efluxo atuam em sinergismo com a baixa permeabilidade da membrana externa. Um aumento do efluxo provoca redução no acúmulo da droga e aumento da concentração inibitória mínima.¹⁶

O *A. baumannii* possui um sistema de efluxo, AdeABC, que pertence a família de transportadores *Resistance Nodulation Division* (RND). Alguns antimicrobianos são substratos deste sistema, incluindo aminoglicosídeos, tetraciclinas, fluorquinolonas, trimetoprima e cloranfenicol.¹⁷ A segunda bomba de efluxo caracterizada em isolados de *A. baumannii*, AbeM, é da família de extrusão de componentes tóxicos e multidrogas. Entre seus substratos estão gentamicina, ciprofloxacino, eritromicina e trimetoprima. A contribuição deste sistema na resistência aos antimicrobianos em isolados clínicos é desconhecida.¹⁸

O principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos é a degradação enzimática pelas β -lactamases. AmpC são cefalosporinases cromossomicamente codificadas comuns a todas as cepas de *A. baumannii*.⁸ A superexpressão desta enzima está relacionada com uma sequência de inserção, *ISAbal*, localizada na porção *upstream* deste gene. A presença deste elemento está correlacionada com o aumento da expressão do gene *AmpC* e a resistência aos β -lactâmicos de amplo espectro.¹⁹

Além da AmpC, outras β -lactamases adquiridas têm sido identificadas como fonte de resistência em *A. baumannii*. Essas enzimas pertencem a classe A, como as β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs) entre outras de menor espectro, classe B (metalo β -lactamases) e a classe D (oxacilinases) de Ambler. As metalo β -lactamases, como VIM e IMP, foram descritas ao redor do mundo e são capazes de hidrolisar todos os β -lactâmicos com exceção do monobactâmicos. Elas se encontram, principalmente, em elementos genéticos móveis facilmente transferidos entre bactérias.^{2,20}

A produção de ESBLs já foi relatada em *A. baumannii*, entretanto a correta avaliação de sua prevalência é prejudicada pela dificuldade em sua detecção nos laboratórios, principalmente na presença de AmpC.⁸

As oxacilinases ou β -lactamases da classe D são as carbapenemases mais amplamente difundidas em *A. baumannii*.² Elas são denominadas como oxacilinases pela sua alta atividade hidrolítica contra a oxacilina, cloxacilina e meticilina.²¹

Em 1993 foi descrito, em uma cepa de *A. baumannii* resistente ao imipenem, um novo grupo de β -lactamases do tipo OXA com capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos. Esta cepa havia sido isolada em uma hemocultura de uma paciente internada em Edimburgo, na Escócia, em 1985.²² Posteriormente, este gene que codifica a enzima ARI-1 (*Acinetobacter resistant to imipenem*) como foi inicialmente denominada foi sequenciado e descobriu-se que ele codificava uma enzima do tipo OXA denominada OXA-23, pertencente a classe molecular D de Ambler.²³

As oxacilinases são frequentemente codificadas por genes localizados em elementos genéticos móveis o que justifica sua disseminação em enterobactérias, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Atualmente, 162 oxacilinases já foram caracterizadas. As β -lactamases do tipo OXA geralmente apresentam um espectro fenotípico restrito, incluindo penicilinas e cefalosporinas de espectro reduzido, entretanto, um aumento de seu espectro incluindo cefalosporinas de amplo espectro e/ou imipenem vem sendo observado.²¹

Estas enzimas geralmente não são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactama e tazobactama mas, *in vitro*, sua atividade pode ser inibida pelo cloreto de sódio diferente das β -lactamases de outras classes.²⁴

As oxacilinases encontradas em *Acinetobacter* spp. podem ser intrínsecas ou adquiridas. A β -lactamase do tipo OXA-51 é uma enzima intrínseca produzida pelo *A. baumannii*. Mais de 45 variantes desta enzima (OXA-51-like) já foram descritas em isolados desta espécie em todo o mundo. A função desta enzima em isolados clínicos permanece controversa. Entretanto, a alta capacidade de hidrólise ao imipenem tem sido associada à aquisição de elementos de inserção, *ISAbal* e *ISAbal9*, na região *upstream* do gene codificante da enzima OXA-51.²⁴

Como citado anteriormente, as carbapenemases adquiridas do tipo OXA possuem fraca atividade hidrolítica contra imipenem e meropenem e, geralmente não hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro e nem aztreonam. Isolados produtores destas enzimas que apresentam resistência aos carbapenêmicos, frequentemente, possuem algum mecanismo de resistência adicional como bomba de efluxo ou perda de porina. Além disso, assim como ocorre com as enzimas OXA-51 e AmpC, a inserção de *ISAbal* na região *upstream* de alguns genes codificantes destas oxacilinases também pode aumentar sua expressão. As β -lactamases do tipo D capazes de hidrolisar carbapenêmicos podem ser divididas em quatro grupos: OXA-23 (incluindo OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-133 e OXA-134), OXA-24/OXA-33/OXA-40 (incluindo OXA-25, OXA-26 e OXA-72), OXA-58 (incluindo OXA-96 e OXA-97) e OXA-143.²¹

O gene *bla*_{OXA-23}, um dos principais responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*, é consuetivo da espécie *Acinetobacter radioresistens*. Esta espécie é comensal e pode ser encontrada na pele de indivíduos saudáveis e de pacientes hospitalizados e, aparentemente, apresenta baixa virulência.²⁵

2.3 OXA Carbapenemases no mundo e no Brasil

O gene *bla*_{OXA-23} é encontrado somente em isolados de *Acinetobacter* spp, com uma única exceção, este gene foi identificado no cromossomo de uma cepa de *Proteus mirabilis* resistente aos carbapenêmicos na França.²⁶ Dados recentes indicam que isolados clínicos de *A. baumannii* produtores da enzima OXA-23, codificada por plasmídeos ou cromossomos, já foram descritos na maioria dos continentes. As enzimas OXA-24/OXA-33/OXA-40, OXA-25 e OXA-26 também podem ser plasmidiais ou cromossomais e, são encontradas em isolados de *A. baumannii*, principalmente na Europa. A OXA-72 foi identificada na China, Coreia do Sul, Taiwan, Itália, França e Brasil.²⁷ OXA-58 também foi descrita em diversos países do mundo e, assim como OXA-96 e OXA-97, são codificadas somente por plasmídios.^{21,24}

No Brasil, em 2003 foi descrito o primeiro surto de *A. baumannii* produtor da enzima OXA-23. Oito isolados resistentes aos carbapenêmicos foram identificados em dois hospitais de Curitiba. Genes codificantes de carbapenemases da classe B, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}, e da classe D, *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-24}, foram investigados pela técnica de PCR. Somente o gene *bla*_{OXA-23} foi detectado nos 8 isolados, todos apresentavam o mesmo perfil genotípico. Os oito pacientes recebiam ventilação mecânica e cinco foram a óbito.²⁸

Na cidade de Porto Alegre, no período de 2004 a 2008, foram identificados mais de 500 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos em um surto envolvendo 16 hospitais. A presença dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} e *bla*_{OXA-58} foi investigada em 53 isolados selecionados aleatoriamente. Todos os isolados foram positivos para *bla*_{OXA-23} e negativos para *bla*_{OXA-24} e *bla*_{OXA-58}.²⁹

Werneck e colaboradores relataram a presença da enzima OXA-72 (OXA-24-like) em uma cepa de *A. baumannii* isolada de hemocultura. Esta enzima foi localizada em um plasmídeo e não estava associada a sequência de inserção *ISAbal1*. O isolado apresentava resistência aos carbapenêmicos.²⁷

Recentemente, em São Paulo, foi descrita a enzima OXA-143 em isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. Esta enzima foi considerada a primeira representante da quarta classe das β -lactamases do tipo D capaz de hidrolisar carbapenêmicos. Dos 50 isolados resistentes aos carbapenêmicos analisados pelo estudo, 9 eram produtores da enzima OXA-23 e 38 produtores de OXA-143.¹⁵

Entre 2005 e 2006, foram avaliados 20 isolados de ABMR, no Rio de Janeiro. O gene *bla*_{OXA-23} foi detectado em 3 isolados e em 1 isolado foi detectada a presença do gene *bla*_{OXA-58}, nos demais não houve amplificação pela técnica PCR. Dentre os 20 isolados incluídos no estudo, somente os 4 nos quais foram detectadas as β -lactamases do tipo D eram resistentes aos carbapenêmicos.³⁰

De acordo com a literatura, uma terapia antimicrobiana adequada e precoce pode diminuir, significativamente, os índices de mortalidade associados a infecções por *A.*

baumannii. Surtos envolvendo cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos foram descritos no mundo inteiro, inclusive no Brasil. Em nosso país, foram identificadas enzimas pertencentes aos quatro grupos de β -lactamases do tipo D capazes de hidrolisar os carbapenêmicos, OXA-23, OXA-24, OXA-143 e OXA-58. Dentre estas enzimas, a OXA-23 representa a enzima mais frequentemente encontrada.³¹

2.4 Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV)

2.4.1 Patogênese

Na maioria das instituições, grande parte dos isolados de *A. baumannii* é proveniente do trato respiratório de pacientes hospitalizados e, está relacionado, principalmente, à PAV em pacientes de unidades de terapia intensiva (UTIs).⁸

A pneumonia é provocada pela invasão de microrganismos no trato respiratório inferior e no parênquima pulmonar, normalmente estéreis. O trato respiratório humano possui uma variedade de defesas naturais como: barreiras anatômicas, tosse, secreções traqueobrônquicas, aparato mucociliar, imunidade celular e humoral e sistema fagocítico composto por macrófagos alveolares e neutrófilos. O comprometimento destas defesas ou uma grande quantidade de inóculo de determinado microrganismo resulta em pneumonia.³²

A PAV é uma infecção pulmonar que ocorre no mínimo 48 horas após o início da ventilação mecânica.³³ A intubação além de comprometer a barreira anatômica entre a orofaringe e a traqueia, facilita a entrada de bactérias no pulmão através do acúmulo de

secreções no tubo endotraqueal. Portanto, a colonização da orofaringe representa um importante fator de risco para o desenvolvimento de PAV.³⁴

2.4.2 Morbidade e Mortalidade

A PAV representa a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes de UTIs³⁵ e está associada com um aumento no tempo de internação hospitalar e na UTI. De acordo com a literatura, o índice de mortalidade de pacientes com PAV nestas unidades é de duas a dez vezes maior do que pacientes sem pneumonia, variando de 24 a 76% em diferentes instituições. A determinação destes índices é difícil devido à dificuldade em se estabelecer um diagnóstico preciso desta patologia e pela interferência da doença de base no desfecho destes pacientes.³²

O prognóstico de PAV causada por bacilos Gram negativos é consideravelmente pior do que as causadas por cocos Gram positivos considerando ambos os microrganismos multissensíveis.³² E um estudo, a mortalidade associada à pneumonia por *Pseudomonas* spp ou *Acinetobacter* spp foi de 87% comparando com 55% das pneumonias causadas por outros microrganismos.³⁶ Kollef e colaboradores também demonstraram que pacientes com PAV por patógenos de alto risco como *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* spp e *Stenotrophomonas maltophilia* apresentaram uma taxa de mortalidade maior (65%) do que pacientes com PAV por outros germes (31%).³⁷

2.4.3 Agentes etiológicos

A frequência dos patógenos relacionados à PAV varia, consideravelmente, dependendo das características da população estudada. Os fatores de riscos associados com PAV por germes multirresistentes são: uso prévio de antimicrobianos, tempo de hospitalização superior a cinco dias, imunossupressão causada por doença ou medicamentos e tempo de ventilação mecânica anterior ao desenvolvimento da PAV.^{32,38}

Dentre os fatores citados acima, o principal determinante do agente microbiológico da PAV e do seu perfil de resistência parece ser o tempo de ventilação mecânica antes do início da pneumonia.³⁹ Quando a PAV se desenvolve nos primeiros quatro dias de intubação é denominada pneumonia de início precoce e, geralmente, é causada por bactérias mais sensíveis aos antimicrobianos como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina e cepas de enterobactérias sensíveis. Por outro lado, se a PAV tem início após cinco dias de intubação é classificada como tardia e está associada, principalmente, com patógenos multirresistentes como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. aureus* resistente à oxacilina.³²

2.4.4 PAV e *Acinetobacter* spp.

Durante os anos 70, o *Acinetobacter* spp emergiu como um importante patógeno nosocomial provavelmente como uma consequência, pelo menos em parte, da crescente utilização de antimicrobianos de amplo espectro nos hospitais. Nestas últimas décadas, o número de isolados de *Acinetobacter* spp, principalmente em amostras respiratórias, tem aumentado significativamente, tornando-o um problema de saúde pública.⁴⁰

Surtos envolvendo infecções por *Acinetobacter* spp representam um grande problema em ambientes hospitalares, principalmente quando este patógeno está relacionado à PAV ou outras infecções que acometem pacientes UTIs. A transmissão deste germe entre pacientes ocorre por diversos fatores como colonização de diferentes sítios anatômicos dos pacientes, fácil disseminação no ambiente, sobrevivência por longos períodos em superfícies secas e nas mãos de profissionais da saúde e capacidade de desenvolver ou adquirir resistência a praticamente todas as classes de antimicrobianos.⁴¹

Muitos estudos têm analisado os aspectos epidemiológicos e desfechos clínicos da PAV. Entretanto, as informações sobre os fatores de risco e o curso desta patogenia causada por *A. baumannii* são escassos. Além disso, resultados discrepantes em relação ao impacto clínico deste germe em PAV foram descritos.⁴⁰

De acordo com um estudo realizado por Baraibar e colaboradores, traumatismo craniano, história de doença cardíaca, neurocirurgia, síndrome do desconforto respiratório agudo, exposição prévia a antimicrobianos e reintubação constituem fatores de risco associados com desenvolvimento de PAV por *A. baumannii*.⁴²

2.4.5 Diagnóstico

O diagnóstico de PAV geralmente é complicado e, em alguns casos, pode ser difícil de diferenciar infecção de colonização.^{8,43} A colonização é definida pela presença de um microrganismo no trato respiratório inferior sem achados clínicos e radiológicos de infecção.³⁵

O diagnóstico inicial de PAV é baseado em sinais clínicos como febre, secreção traqueobrônquica purulenta e leucocitose e na presença de novos ou progressivos infiltrados radiológicos. A combinação destes achados clínicos e radiológicos possui alta sensibilidade, mas baixa especificidade, uma vez que podem estar presentes em outras patologias que acometem pacientes de UTI.³⁴

Além da avaliação clínica e dos exames por imagem, as culturas bacteriológicas são fundamentais para o diagnóstico de PAV. Os diferentes espécimes clínicos do trato respiratório inferior utilizados na cultura quantitativa parecem ser equivalentes em especificidade e sensibilidade no diagnóstico desta patologia.³⁶ Por isto, amostras colhidas por técnicas invasivas, como lavadobroncoalveolar e escovado brônquico protegido, só são recomendadas em pacientes imunodeprimidos, para os outros pacientes são recomendadas culturas quantitativas de amostras não invasivas, como escarro e aspirado traqueal.³⁴

Nas culturas quantitativas são consideradas significativas contagens de bactérias superiores a 10^3 UFC/mL em amostras de escovado brônquico protegido, $> 10^4$ UFC/mL em lavado broncoalveolar e $>10^5$ ou 10^6 UFC/mL em amostras de aspirado traqueal.^{35,36} Crescimentos bacterianos com contagem superior aos pontos de corte citados acima indicam com maior especificidade que o microorganismo isolado está associado com a etiologia da PAV enquanto que contagens inferiores sugerem colonização ou contaminação.³⁴

As técnicas de bacteriologia empregadas na rotina para a detecção e quantificação de *A. baumannii* demandam tempo e possuem menor sensibilidade do que técnicas moleculares, como qPCR. Por isso, a Biologia Molecular pode ser considerada uma ferramenta complementar no diagnóstico de doenças infecciosas. Dados sobre o diagnóstico rápido de *A.*

baumannii diretamente de espécimes clínicos, em particular espécimes respiratórios, são raros. O tempo de uma reação de qPCR é inferior a duas horas e produz resultados com alta sensibilidade e especificidade.⁴⁴ O tratamento antimicrobiano adequado à PAV melhora significativamente o desfecho clínico dos pacientes, sendo assim, um diagnóstico rápido e a escolha correta do agente antimicrobiano representam importantes objetivos clínicos.⁴¹

2.4.6 Métodos moleculares

O diagnóstico microbiológico vive uma nova era. Técnicas de amplificação e detecção de ácido nucléicos vêm substituindo os tradicionais testes baseados no fenótipo dos patógenos. A PCR (reação em cadeia da polimerase) representa a técnica mais utilizada no diagnóstico molecular e, seu emprego na detecção de microrganismos vem aumentando significativamente.⁴⁵

Os testes microbiológicos tradicionais incluem microscopia, cultura e sorologia. Estes testes podem ser limitados pela baixa sensibilidade, microrganismos de crescimento lento, interpretação complexa,, terapia antimicrobiana entre outros. No entanto, a cultura microbiológica fornece dados epidemiológicos importantes, revelando organismos novos, não caracterizados ou atípicos, por isso, representa uma ferramenta fundamental de estudo.⁴⁵

Na técnica de qPCR a etapa de amplificação e a etapa de detecção dos ácidos nucléicos podem ocorrer ao mesmo tempo, em tubos fechados, minimizando assim, o risco de contaminações cruzadas com produtos amplificados. A combinação da excelente sensibilidade e especificidade, baixo risco de contaminação, facilidade de manuseio e rapidez

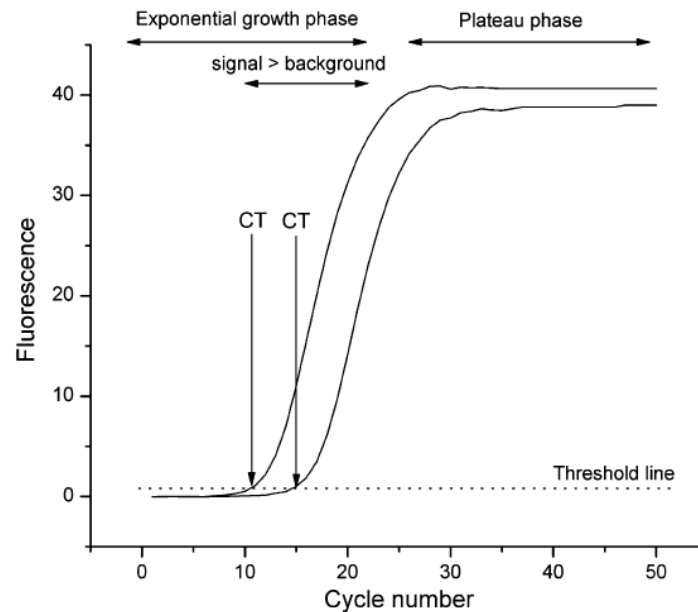
tornam esta técnica uma alternativa atraente para a complementação dos métodos tradicionais empregados no laboratório de microbiologia clínica.^{45,46}

A qPCR requer uma plataforma que contém um termociclador com sistema ótico para a excitação e coleção da emissão da fluorescência, e um computador com software apropriado para aquisição de dados e análise final da reação. Atualmente, diversas plataformas de instrumentos estão disponíveis de diversos fabricantes, sendo que a diferença entre elas está na capacidade do número de amostras, quantidade de canais para excitação e captação da fluorescência, velocidade e sensibilidade. Há também diferenças nos softwares para o processamento dos dados.⁴⁷

Quatro tipos de fluorescência são comumente utilizadas para a detecção dos produtos de PCR gerados na técnica de qPCR, sondas tipo *TaqMan*, *molecular beacons*, sondas de hibridização *FRET* (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) e *SYBR green*.⁴⁶ Em todos os casos, a detecção baseia-se na mensuração da fluorescência emitida que é proporcional a quantidade do produto da qPCR gerado em cada ciclo da reação. Durante a reação, é gerada uma curva que mostra o ponto exato (número de ciclos) onde ocorre a amplificação exponencial do produto da qPCR, sendo este dado utilizado para o cálculo do número inicial de cópias do ácido nucléico. Os ácidos nucléicos são quantificados nesta fase utilizando-se uma curva de calibração gerada com padrões com concentração conhecida do DNA alvo, o que garante maior precisão e reprodutibilidade.⁴⁸ Durante os primeiros ciclos o sinal emitido pelo fluoróforo é fraco e não é possível sua distinção do *background*. Com o acúmulo do produto o sinal fluorescente aumenta exponencialmente, continuando até a saturação ou esgotamento dos componentes da reação, como primers e dNTPs, resultando em um platô. O

cycle threshold (CT) é o ciclo no qual a fluorescência emitida pelo produto amplificado ultrapassa o limiar de detecção. O ponto CT indica o momento a partir do qual a reação é otimizada (fase exponencial) e o produto amplificado é quantificado.⁴⁷

Figura 1: Curva gerada pela reação da PCR em tempo real



O CT indica o início da fase exponencial, ou seja, ponto no qual a fluorescência emitida pelo produto amplificado ultrapassa o limiar de detecção. O sinal aumenta exponencialmente até atingir o platô.

Fonte: Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.⁴⁷

O *SYBR green* é uma alternativa mais simples e econômica quando comparada ao uso de sondas marcadas com fluoróforos. Esta molécula é capaz de absorver e emitir luz em um comprimento de onda específico (530 nm).⁴⁸ *SYBR green*, como outros fluoróforos intercalantes, emitem fluorescência somente quando estão ligados ao DNA, quando estes componentes estão livres em uma solução eles não são capazes de emitir fluorescência.⁴⁷

O *SYBR green* é um tipo de fluorescência que pode ser facilmente aplicada e não necessita de uma sonda adicional.⁴⁸ Este método detecta o acúmulo de qualquer produto de PCR gerado, específicos ou não específicos, por isso requer uma análise cuidadosa para diferenciar os produtos específicos dos não específicos através da curva de *melting*.⁴⁸ A curva de *melting* permite a diferenciação dos produtos amplificados através da temperatura de fusão (desnaturação) das cadeias de DNA de fita duplas geradas durante a reação da PCR. Após o término da reação, é realizado um aquecimento progressivo da amostra, normalmente entre 60 e 95°C, captando-se a fluorescência durante todo o processo. Em uma determinada temperatura, que depende da concentração de citosina e guanidina (%CG) de cada fragmento e de seu tamanho, ocorre a abertura da fita de DNA, havendo neste momento uma queda abrupta da fluorescência pela saída do *SYBR green*. Esta temperatura é chamada de temperatura de *melting* (T_m) e é sempre constante para o mesmo produto de PCR, podendo ser utilizada para diferenciação de outros produtos inespecíficos que possam ter sido gerados na reação.⁴⁶

Os ensaios de qPCR são extremamente úteis no estudo dos agentes microbianos em doenças infecciosas, apresentando sensibilidade similar ou superior aos métodos tradicionais, além de serem mais rápidos e menos trabalhosos.⁴⁹ Estes ensaios detectam e quantificam ácidos nucleicos de patógenos vivos e mortos enquanto os métodos tradicionais de cultivo avaliam somente patógenos vivos. A maioria dos estudos descritos na literatura mostra um aumento na frequência da detecção microbiana quando comparado com outras técnicas que não PCR.⁴⁵

A detecção do DNA bacteriano de amostras clínicas como sangue, plasma, líquido e outros espécimes tem sido utilizada com sucesso. A detecção precoce e o tratamento

adequado de infecções bacterianas tem grande impacto no desfecho clínico dos pacientes com infecções sistêmicas. Na prática, a maioria das infecções são tratadas de forma empírica com antibióticos de amplo espectro devido ao tempo necessário para a liberação do resultado final dos testes microbiológicos empregados na rotina.⁵⁰

Um estudo realizado por Keum e colaboradores avaliou a detecção de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, importantes patógenos nosocomiais, empregando a técnica de DNA *microarray*. Foram utilizadas sondas baseadas na sequência 23S do DNA ribossomal das bactérias mencionadas. Comparando esta técnica com a cultura ou sequenciamento direto, a sensibilidade e especificidade na detecção dos patógenos em amostras clínicas como escarro, fezes, urina, líquido, sangue e pus foi de 84,6% e 100% para *A. baumannii* e de 96,2% e 100% para *P. aeruginosa*, respectivamente.⁵¹

Alguns estudos utilizando a técnica de qPCR para detecção de genes de resistência em amostras clínicas também estão sendo publicados. Nass e colaboradores utilizaram esta técnica para detecção de genes produtores de NDM-1 de amostras de fezes artificialmente contaminadas com isolados produtores desta enzima e isolados não produtores. A detecção do gene *bla*_{NDM-1} direto da amostra clínica mostrou excelente sensibilidade e especificidade, com limites de detecção inferiores aos da cultura bacteriológica e, com um ganho de tempo significativo para obtenção do resultado final, 4 horas versus 48 horas da cultura. A identificação de isolados produtores de NDM-1 tanto em bactérias relacionadas com alguma infecção clínica ou mesmo colonizantes é fundamental para prevenir a disseminação destes patógenos.⁵²

Os resultados obtidos por Hindiyeh e colaboradores na detecção de genes produtores de KPC em amostras de swab anal/perianal também foram excelentes. A rápida detecção de genes *bla*_{KPC} é de extrema importância uma vez que microrganismos multirresistentes possuem o potencial de se disseminarem rapidamente no ambiente hospitalar, podendo causar infecções nosocomiais com altos índices de mortalidade. Além disso, a detecção de patógenos resistentes aos carbapenêmicos é problemática, pois alguns isolados expressam baixos níveis de resistência e não são capazes de serem detectados pelos métodos convencionais.⁵³

Estudos que avaliem o custo benefício da técnica de qPCR comparado com os métodos tradicionais para a detecção de patógenos ou de enzimas de resistência são necessários. Um resultado rápido e preciso é fundamental para que sejam tomadas as providências adequadas, sejam elas medidas de bloqueio, início ou suspensão de uma terapia antimicrobiana. Sabe-se que um tratamento adequado implica uma diminuição da morbidade, de custos relacionados a exames adicionais e tempo internação. Por outro lado, um resultado negativo evitaria ou diminuiria o tempo do tratamento empírico minimizando o risco de efeitos adversos e o surgimento de resistência a drogas.^{46,54}

2.4.7 Tratamento

Os carbapenêmicos constituem a melhor opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas por ABMR. Eles possuem excelente atividade bactericida e são estáveis a maioria das β -lactamases. Infelizmente, o aumento da resistência a esta classe de antimicrobianos em *A. baumannii* representa um desafio terapêutico, uma vez que grande

parte destes isolados é resistente a maioria dos outros antimicrobianos, com exceção da polimixina e da tigeciclina.²

As polimixinas foram desenvolvidas há mais de 50 anos mas, por um longo período, esta classe de antimicrobianos não foi utilizada devido a sua toxicidade. Nos últimos anos, ressurgiu como última opção no tratamento de infecções causadas por bacilos Gram negativos multirresistentes, como *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.²¹ Estudos atuais sugerem que a nefrotoxicidade causada por estas drogas é menor do que se imaginava.⁵⁵ A polimixina intravenosa pode ser utilizada com sucesso no tratamento de PAV por *A. baumannii*. A resistência deste patógeno a esta droga é rara.²

Uma série de estudos publicados aponta a tigeciclina com uma boa opção no tratamento contra infecções por ABMR. Entretanto, não há padronização dos pontos de corte para a interpretação da sensibilidade deste antimicrobiano pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).^{21,56}

Sulbactama é o inibidor de β -lactamases com melhor atividade contra *A. baumannii*. Estudos indicam a eficácia deste antimicrobiano no tratamento contra infecções graves, como pneumonia, causadas por *A. baumannii*, mesmo em casos de resistência aos carbapenêmicos.^{57,58}

Os aminoglicosídeos geralmente são utilizados em terapia combinada e, seu uso em longos tratamentos não é indicado devido a sua toxicidade. O uso de aminoglicosídeos no tratamento de PAV é inadequado devido a baixa penetração desta droga no pulmão.⁵⁴

A terapia antimicrobiana combinada parece ser uma alternativa interessante para combater infecções por ABMR. Algumas combinações sugeridas correspondem a imipenem e amicacina, polimixina e rifampicina e, imipenem, polimixina e rifampicina. Entretanto, estudos adicionais são necessários pois a experiência clínica com este tipo de terapia é limitada.²

O tratamento de infecções por ABMR, principalmente os resistentes aos carbapenêmicos, representa um desafio. A literatura científica necessita de estudos clínicos que avaliem a eficácia de determinados antimicrobianos contra isolados de *A. baumannii* com mecanismos de resistência específicos. Até o momento, não estão sendo desenvolvidas novas classes de agentes antimicrobianos capazes de transpor os mecanismos de resistência já descritos. O conhecimento desses mecanismos combinado com o conhecimento das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (PK/PD) dos antimicrobianos parece ser a melhor opção para escolha terapêutica adequada em infecções por patógenos multirresistentes.²¹

Independentemente da opção terapêutica a ser empregada, a detecção precoce da resistência aos carbapenêmicos pode potencialmente mudar o prognóstico dos pacientes com PAV por *A. baumannii*. Esta classe de drogas é comumente utilizada na terapia empírica dessas infecções, sendo assim, a detecção precoce de sua resistência possibilita que o tratamento adequado seja empregado em menor tempo.²

3 JUSTIFICATIVA

A elevada prevalência de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos em espécimes clínicos, principalmente àqueles relacionados ao trato respiratório inferior, representa um problema de saúde pública em nosso estado e país. Sabe-se que o principal mecanismo responsável por esta resistência é a produção da enzima OXA-23, codificada pelo gene *bla*_{OXA-23}. A detecção deste gene direto de amostras respiratórias de pacientes com suspeita de pneumonia associada à ventilação mecânica representa uma importante ferramenta para o diagnóstico etiológico precoce deste patógeno, bem como, para a escolha adequada da terapia antimicrobiana.

4 OBJETIVO

Padronizar a técnica de qPCR, utilizando *SYBR green*, para a detecção do gene *bla*_{OXA-23} diretamente de aspirados traqueais de pacientes em ventilação mecânica internados em UTIs.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bergogne-Berezin, E., and K. J. Towner. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 9:148–165.
2. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 2007 Dec;5(12):939-51.
3. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. N Engl J Med. 2008 Mar 20;358(12):1271-81
4. Bouvet, P. J. M., and P. A. D. Grimont. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1986 Apr;36:228-240.
5. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. APMIS. 1989 Jul;97(7):595-605.
6. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol. 1991 Feb;29(2):277-82.
7. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov.

- (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol. 2011 May;162(4):393-404.
8. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008 Jul;21(3):538-82.
 9. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin Infect Dis. 2006 Mar 1;42(5):692-9.
 10. van den Broek PJ, Arends J, Bernardts AT, De Brauwier E, Mascini EM, van der Reijden TJ, et al. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. Clin Microbiol Infect. 2006 Sep;12(9):837-43.
 11. Lee JH, Choi CH, Kang HY, Lee JY, Kim J, Lee YC, et al. Differences in phenotypic and genotypic traits against antimicrobial agents between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. J Antimicrob Chemother. 2007 Apr;59(4):633-9.
 12. Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2007 Jun;59(6):1210-5.
 13. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet. 2006 Jan;2(1):e7.
 14. Gribun A, Nitzan Y, Pechatnikov I, Hershkovits G, Katcoff DJ. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from

- a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol*. 2003 Nov;47(5):434-43.
15. Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 May;39(5):396-401.
 16. Poole K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002 Jun;3(2):77-98.
 17. Nemeč A, Maixnerová M, van der Reijden TJK, van den Broek PJ, Dijkshoorn L. Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jun; 60: 483–489.
 18. Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Oct;49(10):4362-4.
 19. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Oct;52(4):629-35.
 20. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Sep;12(9):826-36..

21. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Jan;8(1):71-93.
22. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG. ARI 1:beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 1993 Feb;2(2):81-7.
23. Donald HM, Scaife W, Amyes SB, Young HK. Sequence Analysis of ARI-1, a Novel OXA b-Lactamase, Responsible for Imipenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jan;44(1):196-9.
24. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):24-38.
25. Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr;52(4):1252-6.
26. Bonnet R, Marchandin H, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, et al. Chromosome-encoded class D beta-lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jun;46(6):2004-6.
27. Werneck JS, Picao RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Feb;66(2):452-4.
28. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul;41(7):3403-6.

29. Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection*. 2009 Oct;37(5):474-6.
30. Figueiredo DQ, Santos KR, Pereira EM, Schuenck RP, Mendonca-Souza CR, Teixeira LM, et al. First report of the *bla*_{OXA-58} gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 May;106(3):368-70.
31. Prates CG, Martins AF, Superti SV, Lopes FS, Ramos F, Cantarelli VV, et al. Risk factors for 30-day mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in an intensive care unit. *Epidemiol Infect*. 2011 Mar;139(3):411-8.
32. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Apr 1;165(7):867-903.
33. Erdem I, Ozgultekin A, Inan AS, Dincer E, Turan G, Ceran N, et al. Incidence, etiology, and antibiotic resistance patterns of gram-negative microorganisms isolated from patients with ventilator-associated pneumonia in a medical-surgical intensive care unit of a teaching hospital in Istanbul, Turkey (2004-2006). *Jpn J Infect Dis*. 2008 Sep;61(5):339-42.
34. Rotstein C, Evans G, Born A, Grossman R, Light RB, Magder S, et al. Clinical practice guidelines for hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in adults. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2008 Jan;19(1):19-53.

35. Abu-Salah T, Dhand R. Inhaled antibiotic therapy for ventilator-associated tracheobronchitis and ventilator-associated pneumonia: an update. *Adv Ther.* 2011 Sep;28(9):728-47.
36. Rea-Neto A, Youssef NC, Tuche F, Brunkhorst F, Ranieri VM, Reinhart K, et al. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia: a systematic review of the literature. *Crit Care.* Apr 2008;12(2):R56.
37. Kollef MH, Silver P, Murphy DM, Trovillion E. The effect of late-onset ventilator-associated pneumonia in determining patient mortality. *Chest.* 1995 Dec;108(6):1655-62.
38. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Feb 15;171(4):388-416.
39. Park DR. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. *Respir Care.* 2005 Jun;50(6):742-63; discussion 63-5.
40. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernandez-Hinojosa E, Aldabo-Pallas T, Cayuela A, Marquez-Vacaro JA, et al. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med.* 2005 May;31(5):649-55.
41. Hospital-acquired pneumonia in adults: diagnosis, assessment of severity, initial antimicrobial therapy, and preventive strategies. A consensus statement, American Thoracic Society, November 1995. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 May;153(5):1711-25.

42. Baraibar J, Correa H, Mariscal D, Gallego M, Valles J, Rello J. Risk factors for infection by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients with nosocomial pneumonia. *Chest*. 1997 Oct;112(4):1050-4.
43. Hartzell JD, Kim AS, Kortepeter MG, Moran KA. *Acinetobacter* pneumonia: a review. *Med Gen Med*. 2007 Jul;9(3):4..
44. Nomanpour B, Ghodousi A, Babaei A, Abtahi H, Tabrizi M, Feizabadi M. Rapid, cost-effective, sensitive and quantitative detection of *Acinetobacter baumannii* from pneumonia patients. *Iran J Microbiol*. 2011 Dec;3(4):162-9.
45. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Mar;10(3):190-212.
46. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Jan;19(1):165-256.
47. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.
48. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trend Mol Med* 2002 Jun; 8: 257– 260.
49. Hein I, Klein D, Lehner A, Bubert A, Brandl E, Wagner M. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. *Res Microbiol*. 2001 Jan-Feb;152(1):37-46.

50. Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, Book M, Hoeft A, Stuber F. Real-time PCR for detection and differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol*. 2002 Nov;40(11):4304-7.
51. Keum KC, Yoo SM, Lee SY, Chang KH, Yoo NC, Yoo WM, et al. DNA microarray-based detection of nosocomial pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Mol Cell Probes*. 2006 Feb;20(1):42-50.
52. Naas T, Ergani A, Carrer A, Nordmann P. Real-time PCR for detection of NDM-1 carbapenemase genes from spiked stool samples. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Sep;55(9):4038-43.
53. Hindiyeh M, Smollen G, Grossman Z, Ram D, Davidson Y, Mileguir F, et al. Rapid detection of *bla*_{KPC} carbapenemase genes by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2008 Sep;46(9):2879-83.
54. Kollef MH. Review of recent clinical trials of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: a perspective from academia. *Clin Infect Dis*. 2010 Aug 1;51 Suppl 1:S29-35.
55. Chan JD, Graves JA, Dellit TH. Antimicrobial treatment and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *J Intensive Care Med*. 2010 Nov-Dec;25(6):343-8.
56. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI. Document M100-S22. Wayne, PA, CLSI, 2012.
57. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis*. 2010 Jul 1;51(1):79-84.

58. Neonakis IK, Spandidos DA, Petinaki E. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Feb;37(2):102-9.

6 ARTIGO

Artigo submetido à publicação em Letters Applied Microbiology (LAM).

Número do manuscrito: LAM-2012-1390.

Direct detection of *bla*_{OXA-23} gene from endotracheal aspirates by real time PCR

F.R. Brust,¹ L. Massi,² V.V. Cantarelli,³ A. P. Zavascki³

¹ Post-Graduate Medical Sciences Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Microbiology Laboratory, Hospital São Lucas, Porto Alegre, Brazil

³ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Brasil

⁴ Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil

Running title: Detection of *bla*_{OXA-23} gene from ETA

Corresponding author: A. P. Zavascki - Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil Fone/fax: +55 (51) 33598152, e-mail: azavascki@hcpa.ufrgs.br

Significance and Impact of Study

Shortening the time for the detection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by real-time PCR directed to carbapenemase genes from endotracheal aspirates in patients with proved or suspected ventilator-associated pneumonia may lead to an earlier initiation of appropriate therapy for such severe infection. This may potentially results in clinical outcomes for these patients.

Abstract

This study aimed to develop a SYBR green-based real time PCR (qPCR) to detect the *Acinetobacter baumannii* *bla*_{OXA-23} gene directly in endotracheal aspirate (ETA) of patients under mechanical ventilation with suspected ventilator-associated pneumonia (VAP). Twenty ETA samples were submitted to DNA extraction and analyzed by qPCR for the presence of *bla*_{OXA-23}. Of the 10 carbapenems-resistant *A. baumannii* (CRAB), eight were positive for *bla*_{OXA-23} on both the colony and ETA. In one *bla*_{OXA-23} qPCR was negative in colony and directly from ETA, while the other showed a qPCR negative result in the colony and positive in the ETA. In three carbapenem-susceptible *A. baumannii*, two samples showed negative results in colony and ETA and one showed a *bla*_{OXA-23} positive result only from the ETA. None of the 7 negative ETAs were positive for *bla*_{OXA-23} gene in the qPCR of the ETA. Our study suggests that qPCR can be applied to detect the presence of *bla*_{OXA-23} gene directly from ETAs.

Keywords: *A. baumannii*, OXA-23, carbapenemases, real time PCR, endotracheal aspirates, pneumonia.

Introduction

Acinetobacter baumannii is a major cause of nosocomial infections, which has emerged worldwide in the last decade (Peleg *et al.* 2008). Carbapenems have been the drug of choice against *A. baumannii*, but their activity has been seriously threatened by the widespread of carbapenem-hydrolyzing- β -lactamases-producing strains (Poirel *et al.* 2010). Ambler Class D carbapenemases (OXA-type) are the main carbapenemases produced by *A. baumannii* (Zavascki *et al.* 2010). Among OXA-carbapenemases, the OXA-23 has been the most frequently described enzyme in carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) isolates from many countries (Zavascki *et al.* 2010).

Ventilator-associated pneumonia (VAP) is the second most frequent nosocomial infection among intensive care unit (ICU) patients and it is associated with high mortality (Torres *et al.* 2010). Adequate and early antimicrobial therapy is associated with better outcomes in patients with VAP (File 2010, Prates *et al.* 2011). *A. baumannii* isolates are particularly involved in the etiology of VAP (Peleg *et al.* 2008). Treatment of patients infected by CRAB, especially those associated with respiratory infections, has been very difficult and therapy is usually based on polymyxins (Fishbain and Peleg 2010). These latter antimicrobials comprise the last line therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacilli and they present a worse toxicity profile if compared with other class of antimicrobials (Zavascki *et al.* 2010). Thus, the use of polymyxins has been guided by the isolation of the organism and detection of carbapenem resistance. However, final results by conventional microbiological methods usually take 2 to 3 days (Espy *et al.* 2006), which consequently results in a delay in commencing appropriate therapy for many carbapenem-resistant isolates, including CRAB

which may potentially contribute to adverse outcomes in patients with severe infections such as VAP.

Since CRAB is an increasing cause of VAP and the major carbapenem resistance mechanism is OXA-23 production, we aimed to develop a SYBR green-based real time PCR (qPCR) to detect the *bla*_{OXA-23} gene directly from respiratory tract specimens in patients under mechanical ventilation, thus serving as a surrogate marker for the presence of CRAB in those patients.

Results and Discussion

Among the 20 ETA examined, CRAB isolates were recovered in 10 quantitative cultures, carbapenem-susceptible *A. baumannii* (CSAB) in three and seven cultures were negative to *A. baumannii*.

Of the 10 CRAB, eight were positive for *bla*_{OXA-23} on both colony and ETA samples. In one of them, *bla*_{OXA-23} qPCR was negative in both colony and directly from ETA, while the other showed a qPCR negative result in the colony and positive result in the ETA (Table 1).

When qPCR was applied to detect *bla*_{OXA-23} in the three CSAB isolates, two samples showed negative results in colony and ETA and one of these samples showed a *bla*_{OXA-23} positive result in the qPCR only from the ETA. None of the seven negative to *A. baumannii* ETAs were positive for *bla*_{OXA-23} gene in the qPCR of the ETA (Table1).

Our study presented the validation of a SYBR green-based qPCR for the detection of the *bla*_{OXA-23} gene directly from ETA of patients under mechanical ventilation. The *bla*_{OXA-23} gene is responsible for codifying the OXA-23 enzyme, the most common resistance mechanism to carbapenems in *A. baumannii* isolates (Zavascki *et al.* 2010).

The initial results support the potential use of qPCR to detect this gene directly from ETAs, as surrogate marker for the presence or absence of CRAB in patients under mechanical ventilation. The results can be available in a much shorter period when compared to conventional bacterial culture and susceptibility tests results. Complete culture workup to detect and identify the presence of CRAB in clinical samples may take up to 72h or more. Our qPCR can be performed within one working day, saving time to identify CRAB in patients with proved or suspected VAP, and thus allowing an earlier administration of appropriate therapy.

The number of sample analyzed in this study did not allow a thorough sensitivity and specificity evaluation of the qPCR in ETA, but concordant result rates between both culture and qPCR of ETA and qPCR of the colony and qPCR of ETA were considerably high. Nonetheless, a few disagreements between results were observed.

One culture positive specimen for CRAB presented negative results for *bla*_{OXA-23} in both qPCR of the colony and ETA. It is likely that carbapenem-resistance in such isolate was due to other mechanisms, either by other carbapenemases or by a combination of non-carbapenemases enzymes plus porin modification and/or efflux pump hyperexpression. A thorough investigation of other resistance mechanisms to carbapenems was beyond the scope of our study.

One CRAB and one CSAB presented negative result for *bla*_{OXA-23} in qPCR of the colony, but showed positive qPCR in ETA. Although these may be considered false-positive results, we cannot rule out the real presence of a subpopulation of *A. baumannii* harboring the *bla*_{OXA-23} gene in the samples, which could not be detected by the phenotypic method used to isolate this pathogen from ETA. Although the presence of CRAB in lower numbers may be simply considered colonization, the clinical relevance of such finding and the potential to evolve into a true respiratory infection should still be evaluated in further studies.

In our study, only the presence of *bla*_{OXA-23} gene was tested by qPCR. However, so far, no other OXA-carbapenemase has been described in *A. baumannii* isolates from our city (Martins 2009, Prates 2011). However, other OXA-carbapenemase genes may have higher epidemiological importance in other institutions; thus, a multiplex qPCR for *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24/40}, *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA-143} would be required to promptly detect the presence of carbapenem resistance in other settings.

In summary, our study suggests that qPCR can be applied to detect the presence of *bla*_{OXA-23} gene directly from ETAs and this may be a useful tool for early detection of CRAB in respiratory specimens, potentially shortening the time for initiating appropriate therapy for this difficult to treat infections.

Materials and methods

Clinical Samples

Twenty samples of endotracheal aspirates (ETAs) obtained from August to December 2010 from patients under mechanical ventilation at ICU of Hospital São Lucas, Porto Alegre, Brazil were analyzed in the study. ETAs were routinely collected for culture and direct examination following the request of the attendant physician whenever VAP was suspected in a new patient. Only one specimen per patient was considered.

The ETA was collected by nonbronchoscopic method. It was collected using a suction catheter with a mucus extractor, which was gently introduced through the endotracheal tube (ETT). Gentle aspiration was then performed without instilling saline, and the catheter was withdrawn from the ETT. After removal, 2 mL of sterile 0.9% normal saline was forced into the catheter using a sterile syringe to flush the exudates into a sterile container, and then transported to the microbiology laboratory. ETA samples were immediately processed.

All samples were routinely cultivated in clinical microbiological laboratory. *A. baumannii* were submitted to susceptibility tests following Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines were used to determine the susceptibility profile of the isolates (CLSI, 2010). Only the growth of $\geq 10^5$ CFU/mL of *A. baumannii* was considered positive in ETA culture. The study was approved by the Ethical Committee of Hospital São Lucas.

DNA extraction ETA

Fresh well-isolated colonies of *A. baumannii* from a suitable agar plate (e.g. McConkey Agar) were submitted to DNA extraction using the Invitex RTP DNA/RNA Virus Mini Kit according to the protocol suggested by the manufacturer. A bacterial suspension was prepared in 0.9% sodium chloride to match the 0.5 McFarland standard, and bacterial DNA was extracted from 200µl of the suspension. ETA samples (~400µL) were also submitted to DNA extraction using the same extraction kit.

Real time assay for OXA-23 gene

Two µL of the extracted DNA were used in a total volume of 25 µL of PCR mix containing SYBR Green II (Invitrogen). A new set of primers were specially designed to amplify the *bla*_{OXA-23} gene (forward primer sequence 5'- AAA GAA GTA AAA CGT ATT GGT TTC G - 3' and reverse primers sequence 5' - CCC AAC CAG TCT TTC CAA AA - 3') and were used at 10 pM each per reaction. Real-Time PCR (qPCR) were performed using the LightCycler platform (Roche, Germany) and confirmation of the correct amplicon was done by melting curve analysis (TM ~ 80°C). The specificities of the primers for the detection of *bla*_{OXA-23} gene were evaluated by the BLAST search program. No matches to the primers were found other than *bla*_{OXA-23}.

The specificity of the reaction was confirmed using extracted DNA from several unrelated bacteria (Gram-positive and Gram-negative) of a bacterial collection of one author

(V.V.C.). Direct DNA sequencing was used to further confirm the presence of *bla*_{OXA-23}-like genes in five randomly selected isolates which showed a positive qPCR for this gene.

qPCR was performed under the following conditions: 2 min at 50°C (UDG activation), 10 min at 95°C, and 40 cycles of 0 s at 96°C, 5 s at 60 °C and 8 s at 72°C. After amplification, the PCR products were subjected to melting analysis (gradual heating from 65 – 95 °C). Negative (0.9% sodium chloride) and positive controls were used in each qPCR reaction. The positive control was an OXA-23 producing *A. baumannii* strain that were confirmed by direct sequencing analysis.

Interpretation of the results

A sample was considered positive by qPCR if it crossed the threshold before a threshold cycle (C_T). The results of the ETA qPCR were compared with the phenotypic result of carbapenem resistance in each sample and with the qPCR of the *A. baumannii* colony.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil (479405/2009-3). A. P. Z. is research fellow of CNPq.

Conflicts of interest

None to declare.

References

- American Thoracic Society. (2005). Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 388-416
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI. Document M100-S20. Wayne, PA, CLSI, 2010.
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R., and Smith, T.F. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* **19**, 165-256
- File, T.M. (2010). Recommendations for treatment of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: review of recent international guidelines. *Clin Infect Dis* **51** Suppl 1, S42-7
- Fishbain, J. and Peleg, A.Y. (2010). Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis* **51**, 79-84.
- Martins, A.F., Kuchenbecker, R., Sukiennik, T., Boff, R., Reiter, K.C., Lutz, L., Machado, A.B. and Barth, A.L. (2009) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection* **37**, 474-6.
- Peleg, A.Y., Seifert, H. and Paterson, D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* **21**, 538-82.

- Poirel, L., Naas, T. and Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 24-38.
- Prates, C.G., Martins, A.F., Superti, S.V., Lopes, F.S., Ramos, F., Cantarelli, V.V. and Zavascki, A.P. (2011) Risk factors for 30-day mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in an intensive care unit. *Epidemiol Infect* **139**, 411-8.
- Torres, A., Ferrer, M. and Badia, J.R. (2010). Treatment guidelines and outcomes of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis*, **51** Suppl 1, S48-53
- Zavascki, A.P., Carvalhaes, C.G., Picao, R.C. and Gales, A.C. (2010) Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* **8**, 71-93.

Table 1: Results of quantitative culture, detection of *bla*_{OXA-23} gene by real time PCR (qPCR) from colony and endotracheal aspirate.

Sample	Quantitative culture	Carbapenem susceptibility	Colony qPCR	ETA qPCR
1	<i>A. baumannii</i>	R	Positive	Positive
2	<i>A. baumannii</i>	R	Positive	Positive
3	<i>A. baumannii</i>	R	Positive	Positive
4	<i>A. baumannii</i>	R	Positive	Positive
5	<i>A. baumannii</i>	R	Positive	Positive
6	<i>A. baumannii</i>	R	Positive	Positive
7	<i>A. baumannii</i>	R	Positive	Positive
8	<i>A. baumannii</i>	R	Positive	Positive
9	<i>A. baumannii</i>	R	Negative	Positive
10	<i>A. baumannii</i>	R	Negative	Negative
11	<i>A. baumannii</i>	S	Negative	Negative
12	<i>A. baumannii</i>	S	Negative	Negative
13	<i>A. baumannii</i>	S	Negative	Positive
14	Negative	-	-	Negative
15	Negative	-	-	Negative
16	Negative	-	-	Negative
17	Negative	-	-	Negative
18	Negative	-	-	Negative
19	Negative	-	-	Negative
20	Negative	-	-	Negative

ETA: endotracheal aspirate, R: resistant, S: susceptible