

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Bianca Lúcia Heineck**

**Caracterização e epidemiologia molecular de isolados de *Acinetobacter baumannii* resistente e sensível aos carbapenêmicos em três hospitais de Porto Alegre**

**Porto Alegre**

**2012**

**Bianca Lúcia Heineck**

**Caracterização e epidemiologia molecular de isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes e sensíveis aos carbapenêmicos em três hospitais de Porto Alegre**

**Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.**

**Orientador: Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki**

**Co-orientadora: Juliana Barin (aluna PPG Ciências Médicas/UFRGS)**

**Porto Alegre**

**2012**

**Bianca Lúcia Heineck**

**Caracterização e epidemiologia molecular de isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes e sensíveis aos carbapenêmicos em três hospitais de Porto Alegre**

**Comissão Julgadora do Trabalho de Conclusão de Curso para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas**

**Prof. Dr. Alexabdre Prehn Zavascki**

**orientador**

---

**1º examinador**

---

**2º examinador**

**Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.**

Ao meu filho **Guilherme**,

A quem dedico minha vida e conquistas.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Vera e Cássio, por terem me dado tudo, e principalmente por cuidarem de meu filho para que eu pudesse um dia conquistar um diploma.

À minha irmã, Manuela Heineck e a meu cunhado Fernando Giacomelli, exemplos de esforço e dedicação, meus orgulhos.

Aos colegas e amigos do laboratório de pesquisa em Doenças Infecciosas do Hospital de Clínicas, em especial à Juliana Barin por sua paciência e dedicação.

Aos colegas e amigos de graduação da UFRGS, em especial à Luiza Honaiser por sua amizade e companheirismo.

Aos meus queridos amigos de longa e curta data, aos quais recorri em momentos difíceis e também em momentos de alegria.

Aos centros hospitalares que cederam os isolados clínicos para a realização deste estudo.

Aos laboratórios de rotina e pesquisa que colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Zavascki, pela oportunidade.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1 Características do gênero <i>Acinetobacter spp.</i> .....	14
2.1.1 Taxonomia .....	14
2.1.2 Distribuição no ambiente .....	18
2.1.3 Fatores de virulência e patogenicidade .....	18
2.2 Epidemiologia.....	20
2.3 Resistência aos antimicrobianos em <i>A. baumannii</i> .....	22
2.3.1 Resistência aos carbapenêmicos .....	24
2.3.2 Produção de $\beta$ -lactamases e implicações para a terapia .....	26
2.3.3 Oxacilinases (OXA-carbapenemases).....	29
2.4 Tipagem molecular.....	34
2.5 Medidas de controle de infecção.....	37
2.6 Opções terapêuticas no tratamento de AbRC.....	40
2.6.1 Polimixinas.....	40
2.6.2 Tigeciclina.....	42
2.6.3 Ampicilina-sulbactama .....	43
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>45</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>46</b>
4.1 Objetivo Geral .....	46
4.2 Objetivos Específicos .....	46
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
5.1 Hospitais estudados .....	47
5.1.1 Isolamento e identificação das amostras .....	47
5.2 Testes de Susceptibilidade .....	48
5.2.1 Microdiluição em Placa .....	49
5.2.2 Determinação da CIM .....	50
5.2.3 Controle de Qualidade .....	51
5.3 Análise dos mecanismos de resistência .....	51
5.4 Tipagem molecular por PFGE.....	53

<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## RESUMO

Heineck, BL. Caracterização e epidemiologia molecular de isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes e sensíveis aos carbapenêmicos em três hospitais de Porto Alegre. Porto Alegre, 2012. Trabalho de Conclusão de Curso, Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, UFRGS.

*Acinetobacter baumannii* é uma bactéria de grande importância clínica, sendo causa de diversas infecções nosocomiais, incluindo bacteremias, pneumonia e meningites. O tratamento dessas infecções tem se tornado crítico em função do surgimento de isolados resistentes aos antimicrobianos mais utilizados na prática clínica e também aos carbapenêmicos, tendo como melhor alternativa terapêutica, nestes casos, a polimixina B. O presente estudo avaliou o perfil de susceptibilidade a diferentes classes de antimicrobianos, em especial aos carbapenêmicos e polimixina B, em 132 isolados de *Acinetobacter* spp., isolados no período de março a dezembro de 2011 em três hospitais de Porto Alegre. A susceptibilidade foi avaliada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através da técnica de microdiluição em caldo de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), para os seguintes antimicrobianos: ampicilina/sulbactama, imipenem, meropenem, cefepima, ceftazidima, ciprofloxacina, polimixina B e tigeciclina. Adicionalmente buscou-se avaliar os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos através da pesquisa dos genes codificantes das OXA-carbapenemases prevalentes em *Acinetobacter baumannii*: *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub> através da técnica de PCR multiplex. A epidemiologia molecular dos isolados resistentes aos carbapenêmicos também foi estudada, através da tipagem molecular utilizando-se a técnica de *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). Alta taxa de resistência a todas as classes de antimicrobianos testados, em especial aos carbapenêmicos (67,4%) foi observada nos isolados. Todos os isolados resistentes aos carbapenêmicos foram positivos para o gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, confirmando a identificação da espécie *Acinetobacter baumannii* (94%) e, a presença do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foi observada em todos estes isolados. Nenhum isolado apresentou positividade para os genes *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub>, destes e dos



isolados positivos para a carbapenemase OXA-51-like e negativos para OXA-23-like, todos foram sensíveis aos carbapenêmicos (32,6%). Em 8 (6%) isolados o mecanismo de resistência não pode ser inferido pois não houve amplificação com nenhum dos *primers* utilizados neste estudo. Apenas 4 (3%) isolados foram resistentes à polimixina B, e destes todos foram resistentes aos carbapenêmicos, sendo que 48/132 (36,4%) isolados de *Acinetobacter* foram resistentes a todos os antimicrobianos testados, exceto polimixina B. A maioria desses isolados multirresistentes (MRs) são *A. baumannii* e apresentaram CIMs < 2 µg/ml para tigeciclina. Portanto, polimixina B e tigeciclina permanecem com bom perfil de sensibilidade, inclusive entre isolados MRs, apesar de isolados com resistentes a polimixina B e aos carbapenêmicos terem sido encontrados. A tipagem molecular por PFGE resultou em 12 grupos clonais (similaridade >87%) de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (AbRC), com dois clones majoritários contendo isolados pertencentes a todos os hospitais, o que pode ser indicativo de disseminação inter-hospital destes isolados AbRC na cidade de Porto Alegre.

**Palavras-chave:** *Acinetobacter baumannii*, susceptibilidade, carbapenêmicos, OXA-carbapenemases, PFGE, AbRC.

## ABSTRACT

Heineck, BL. Characterization and molecular epidemiology of carbapenem resistant and sensitive *Acinetobacter baumannii* isolates from three hospitals in Porto Alegre.

*Acinetobacter baumannii* is a bacterium of great clinical importance, being the cause of many nosocomial infections, including bacteremia, pneumonia and meningitis. The treatment of these infections has become critical due to the emergence of multiresistant strains that are resistant to the most commonly used antimicrobial agents in clinical practice and also to carbapenems, polymyxin B is the best therapeutic alternative in such cases. The present study evaluated the susceptibility to different classes of antibiotics, especially carbapenems and polymyxin B, of 132 *Acinetobacter* spp. isolates, obtained from March to December 2011 at three hospitals in Porto Alegre. The susceptibility was evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) using broth microdilution protocol according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria, for the following antimicrobial agents: ampicillin/sulbactam, imipenem, meropenem, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, polymyxin B and tigecycline. Additionally we sought to evaluate the mechanisms of carbapenem resistance by investigating the genes encoding the prevalent OXA-carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*: *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> and *bla*<sub>OXA-143</sub> by multiplex PCR. The molecular epidemiology of carbapenem resistant isolates was also studied by molecular typing using the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique. High rate of resistance to all classes of antimicrobials, especially to carbapenems (67.4%) was observed to almost all isolates. All carbapenem-resistant isolates were positive for the gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, confirming the identification of *Acinetobacter baumannii* (94%) and the presence of *bla*<sub>OXA-23</sub> gene was observed in all these isolates. No isolate was positive for the genes *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> and *bla*<sub>OXA-143</sub>, and all positive isolates for OXA-51-like carbapenemase and negative for OXA-23-like, were sensitive to carbapenems (32.6 %). In 8 (6%) isolates the resistance mechanism could not be inferred since there was no amplification product with the primers used in this study. Only 4 (3%) isolates

were resistant to polymyxin B, and all of these were also resistant to carbapenems, and 48/132 (36.4%) isolates of *Acinetobacter* were resistant to all antibiotics tested, except polymyxin B. The majority of these multiresistant (MR) isolates belong to *A. baumannii* species and have MICs <2 µg/mL for tigecycline. Therefore, polymyxin B and tigecycline remain with good sensitivity profile, even among MR isolates, although isolates resistant to polymyxin B and carbapenems were found. Molecular typing by PFGE resulted in 12 clonal groups (similarity > 87%) of carbapenem resistant *A. baumannii* (CRAb), with two major clones containing isolates belonging to all hospitals, which may be indicative of inter-hospital spread of these CRAb isolates in Porto Alegre city.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, susceptibility, carbapenems, OXA-carbapenemases, PFGE, CRAb.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter*, atualmente classificado na família *Moraxellaceae*, compreende coco-bacilos gram-negativos, não fermentadores de glicose, imóveis, catalase positivos, oxidase negativos, estritamente aeróbios e não esporulados (Peleg *et al.*, 2008).

Sua taxonomia ainda não está bem definida, e a distinção fenotípica das espécies é difícil, até a atualidade já foram descritas em torno de 32 espécies genômicas (geno-espécies) de *Acinetobacter* spp. com base na sequência de DNA e, destas em torno de 19 possuem nomes propostos (Giamarellou *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2009).

*Acinetobacter* spp. encontra-se amplamente distribuído na natureza, no entanto é um patógeno predominantemente hospitalar. A maioria das doenças nosocomiais está associada ao complexo *A.baumannii-calcoaceticus* (*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, geno-espécies 3 e 13TU), sendo *A. baumannii* a espécie de maior relevância clínica (Djkshoorn *et al.* 2007; Peleg *et al.*, 2008; Zarrilli *et al.*, 2009).

As características intrínsecas, além da habilidade que este microorganismo possui em adquirir novas determinantes de resistência, somadas a sua capacidade de permanecer no ambiente por longos períodos, fazem de *A. baumannii* um patógeno nosocomial bem sucedido, levando a um aumento das infecções causadas por *A. baumannii* multirresistente. Dentre elas estão: septicemia, meningites, pneumonias, infecções do trato urinário (Zarrilli *et al.*, 2009).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos está aumentando sua prevalência no mundo todo. Os mecanismos de resistência frequentemente expressos em infecções nosocomiais por *A. baumannii* incluem a produção de  $\beta$ -lactamases, alterações nas porinas e bombas de efluxo. Sendo os mais relevantes decorrentes da produção de  $\beta$ -lactamases adquiridas, principalmente carbapenemases do tipo oxacilinases (OXA) e metalo- $\beta$ -lactamases (MBL) (Higgins *et al.*, 2010). Diferentes surtos causados por *Acinetobacter baumannii* resistente aos

carbapenêmicos (AbRC), têm sido associados a produção destas enzimas cujo significativo impacto clínico e epidemiológico vêm sendo amplamente reportado.

O tratamento preferencial em infecções graves por *A. baumannii* são os carbapenêmicos (Maragakis *et al.*, 2008), porém, nas últimas décadas, alta prevalência de resistência a esta classe de antimicrobianos e surtos relacionados à *A. baumannii* produtor de carbapenemases, em especial oxacilinases, vem sendo reportados em diversos países (Coelho *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Karageorgopoulos DE, Falagas ME, 2008; Mostachio *et al.*, 2012). Deste modo, as polimixinas ressurgem como a melhor opção terapêutica (Zavascki *et al.*, 2010).

Pesquisas buscando determinar a fonte de surtos causados por *A. baumannii* multirresistente, bem como definir a relação genética entre os isolados e as características de disseminação, baseiam-se principalmente em métodos de tipagem molecular como PFGE, ferramenta também importante na avaliação dos fatores de risco para a aquisição de cepas epidêmicas. A prevalência de pesquisas que buscam definir os mecanismos de resistência aos antimicrobianos também tem emergido nos últimos anos (Coelho *et al.*, 2006; Pournaras *et al.*, 2006; Viellegas *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*; 2011).

Dessa forma, embora altas taxas de resistência em isolados de *Acinetobacter* spp. e, em especial *A. baumannii*, venham sendo reportadas, a prevalência da resistência varia de uma região para outra, sendo importante determinar o perfil de susceptibilidade deste patógeno em cada região. Como este patógeno vem se tornando um grave problema na saúde pública, o entendimento sobre a disseminação dos mecanismos de resistência são de extrema importância para auxiliar na implementação de medidas de controle que previnam a disseminação de isolados multirresistentes.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Características do gênero *Acinetobacter* spp.

O gênero *Acinetobacter* spp. compreende cocobacilos Gram-negativos (BGNs), dispostos como diplococos, não fermentadores da glicose, imóveis, oxidase negativa, catalase positiva, estritamente aeróbios e não esporulados (Peleg *et al.*, 2008).

#### 2.1.1 Taxonomia

O gênero *Acinetobacter* spp., sofreu significantes modificações taxonômicas nos últimos anos e ainda hoje sua taxonomia e delineamento das espécies pertencentes a este gênero são objetos de estudo. Ao longo do tempo receberam várias denominações, entre as mais conhecidas estão *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Micrococcus calcoaceticus* e *Moraxella lwoffii*. A publicação taxonômica mais atual propôs a inclusão do gênero na família *Moraxellaceae* (Peleg *et al.*, 2008).

Este grupo apresenta grande similaridade fenotípica, o que dificulta a identificação laboratorial das diferentes espécies. Em 1986, um sistema fenotípico para a identificação de espécies de *Acinetobacter* foi descrito por Bouvet e Grimont., o qual junto com uma versão simplificada descrita posteriormente (Gerner-Smidt *et al.*, 1991), provou ser útil na identificação da maioria mas não de todas as espécies do gênero.

A sua taxonomia ainda não foi adequadamente definida, porém, atualmente o gênero inclui espécies nomeadas, propostas e espécies genômicas (ou geno-espécies) (tabela 1) definidas através de tecnologia de hibridização de DNA, porém estas ainda não são todas nomeadas (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2009). A

maioria das doenças é causada por um complexo de quatro geno-espécies fenotipicamente similares (1, 2, 3 e 13TU). Atualmente todas as quatro espécies são nomeadas *A. calcoaceticus* (genoespécie 1), *A. baumannii* (genoespécie 2), *A. pittii* (genoespécie 3) e *A. nosocomialis* (genoespécie 13TU), e o grupo é referido como complexo *A. baumannii-calcoaceticus* (Murray *et al.*, 2009; Nemeč *et al.*, 2011) por não ser possível fazer sua distinção pelos sistemas fenotípicos de identificação e nem por hibridização de DNA (Tjerneberg & Ursing, 1989; Gerner-Smidt *et al.*, 1991; Djkshoorn *et al.*, 2007). Representam em torno de 75% das espécies encontradas em isolados clínicos, sendo *A. baumannii* a espécie de maior importância clínica (Giamarellou *et al.*, 2008; Peleg *et al.*, 2008). Do ponto de vista clínico, este agrupamento não é adequado, uma vez que inclui as três espécies mais relevantes clinicamente (*A. baumannii*, genoespécies 3 e 13TU), e uma espécie relacionada com o ambiente (*A. calcoaceticus*) (Peleg *et al.*, 2008; Djkshoorn *et al.*, 2007).

**Tabela 1. Descrição das espécies de *Acinetobacter* spp.\* Apenas espécies nomeadas e geno-espécies são mostradas.**

<b>Espécies Nomeadas</b>	<b>Espécie Genômica</b>	<b>Fonte</b>
<i>A. calcoaceticus</i>	1	Humanos, solo
<i>A. baumannii</i>	2	Humanos (clínica), solo, carne, vegetais, ambiente hospitalar
*** <i>A. pittii</i>	3	Humanos (clínica), solo, vegetais
*** <i>A. nosocomialis</i>	13TU	Humanos (clínica)
<i>A. haemolyticus</i>	4	Humanos (clínica)
<i>A. junii</i>	5	Humanos (clínica)
<i>A. johnsonii</i>	7	Humanos,

		animais
<i>A. Iwoffii</i>	8, 9	Humanos
** <i>A. bereziniae</i>	10	Humanos (clínica), solo, vegetais
** <i>A. guillouiae</i>	11	Humanos (clínica), animais, ambiente
<i>A. radioresistans</i>	12	Humanos, solo, algodão
<i>A. ursingii</i>		Humanos (clínica)
<i>A. schindleri</i>		Humanos (clínica)
<i>A. parvus</i>		Humanos (clínica), animais
<i>A. bouvetii</i>		Activated sludge <sup>a</sup>
<i>A. baylyi</i>		Activated sludge <sup>a</sup> , solo
<i>A. towneri</i>		Activated sludge <sup>a</sup>
<i>A. tandoii</i>		Activated sludge <sup>a</sup>
<i>A. grimontii</i>		Activated sludge <sup>a</sup>
<i>A. tjernbergiae</i>		Activated sludge <sup>a</sup>
<i>A. gernerii</i>		Activated sludge <sup>a</sup>
<i>A. venetianus</i>		Água do mar
**** <i>A. brisouii</i>		Pântano
***** <i>A. soli</i>		Solo



***** <i>A. rudis</i>	Leite não pasteurizado e água não tratada
6	Humanos
13BJ/14TU	Humanos (clínica)
14BJ	Humanos (clínica)
15BJ	Humanos
16	Humanos
17	Humanos (clínica)
15TU	Humanos
“entre 1 e 3”	Humanos (apenas clínica)
“fortemente relacionada à 13TU”	Humanos (apenas clínica)

\*Adaptado de Djkshoorn *et al.* (2007)

\*\*Nemec *et al.* (2010)

\*\*\*Nemec *et al.* (2011)

\*\*\*\*Anandham *et al.* (2010)

\*\*\*\*\*Kim *et al.* (2009)

\*\*\*\*\*Vaz-Moreira *et al.* (2011)

<sup>a</sup> A tradução não-litera para o português não foi encontrada pela autora.

**Informação sobre a taxonomia atualizada:** Euzeby JP. Lista de nomes de procariotos com nomenclatura permanente. **Disponível em:** <http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>.

### **2.1.2 Distribuição no ambiente**

A adaptação de *Acinetobacter* a diferentes ambientes pode estar relacionada à ampla diversidade metabólica e nutricional que este grupo apresenta. Algumas espécies já foram isoladas do solo, da água, de vegetais, de animais, e também da pele e do trato gastrointestinal de seres humanos saudáveis. No ambiente nosocomial, *Acinetobacter* foi isolado em objetos inanimados tais como equipamentos de Raios-X, bancadas, leitos, ventiladores e em sistemas de circulação de ar (Djkshoorn *et al.*, 2007; Peleg *et al.*, 2008).

Apesar de serem bactérias amplamente distribuídas na natureza, podendo ser isoladas em objetos animados e inanimados, *Acinetobacter* spp. é um patógeno predominantemente hospitalar, a maioria das espécies até hoje descritas provém de isolados clínicos, no entanto nem todas são clinicamente significantes (Djkshoorn *et al.*, 2007). A tabela 1 mostrada acima traz um resumo atualizado das espécies de *Acinetobacter* spp. e de suas fontes de origem.

### **2.1.3 Fatores de virulência e patogenicidade**

As infecções por *Acinetobacter* tendem a ser oportunistas ocorrendo em pacientes criticamente enfermos. As infecções mais comuns causadas por *Acinetobacter* são: pneumonias nosocomiais, bacteremia, infecções em sítios cirúrgicos, infecções do trato urinário, porém, ocasionalmente alguns pacientes desenvolvem endocardite ou infecções no sistema nervoso central (Murray *et al.*, 2009). Dentre os fatores de risco, para aquisição e infecção por este patógeno, os principais são: trauma, principalmente pacientes que sofrem queimaduras, tempo de permanência no hospital e UTI, cirurgia prévia e utilização de procedimentos invasivos, principalmente ventilação mecânica (Peleg *et al.*, 2008), tratamento antimicrobiano prévio com antimicrobianos de amplo-espectro como cefalosporinas

de terceira geração, fluorquinolonas ou carbapenêmicos (Djkshoorn *et al.*, 2007; Munoz *et al.*, 2007).

*A. baumannii* é a espécie de maior importância clínica do gênero. Apesar de inúmeros dados clínicos e epidemiológicos em relação ao seu papel em infecções nosocomiais, os fatores de virulência específicos e mecanismos de patogenicidade deste microrganismo ainda não foram completamente elucidados. Porém, alguns fatores de virulência e patogenicidade já identificados nesta espécie podem ter um importante papel nos mecanismos de colonização e infecção.

Este microrganismo é reconhecido por sua capacidade de sobreviver por longo período de tempo no ambiente, tendo a capacidade de formar biofilme (provavelmente regulada pela atividade dos genes do *quorum-sensing*) e penetrar nas células epiteliais, fatores estes relacionados com a capacidade que algumas cepas têm para colonizar equipamentos e pacientes internados (Pontes *et al.*, 2006; Lee, HW *et al.* 2008), aumentando as chances de infecção e disseminação.

Um estudo realizado por Choi *et al.* em 2005 com a proteína de membrana externa 38 (Omp38) de *A. baumannii*, relatou que esta pode agir como potencial fator de virulência na indução da apoptose de células epiteliais no estágio inicial de infecção. Além disso, a interação do *pili* e do lipopolissacarídeo (LPS) promovendo adesão às células hospedeiras pode ser a primeira etapa na colonização. Os lipopolissacarídeos (LPS) também estão envolvidos na resistência ao complemento do soro humano e agem em sinergismo com a cápsula exopolissacarídica. O complemento exerce papel na atividade bactericida do soro humano. A cápsula polissacarídica bloqueia o acesso do complemento à parede celular bacteriana e previne a ativação, por caminhos alternativos, do complemento, como foi demonstrado em modelos experimentais de infecções por gram-negativos. A produção de exopolissacarídeo por uma bactéria patogênica é o principal fator de virulência e sabe-se que protege a bactéria das defesas do hospedeiro (Joly-Guillou *et al.*, 2005).

O fato de estar amplamente distribuído no ambiente, sobrevivendo por longos períodos em diferentes condições, além da diversidade de determinantes de resistência, tornam *Acinetobacter* um patógeno nosocomial bem sucedido.

## 2.2 Epidemiologia

*A. baumannii* é um patógeno ubíquo, capaz de causar tanto infecções comunitárias quanto infecções hospitalares, sendo este tipo de infecção mais comum. Em geral, acomete pacientes hospitalizados que foram submetidos a procedimentos invasivos ou pacientes imunocomprometidos tais como aidéticos, transplantados ou em terapia com antineoplásicos (Lima *et al.*, 2008).

Este micro-organismo tem emergido nos últimos anos como importante causa em infecções hospitalares devido a sua grande variedade de mecanismos de resistência e a sua propensão de causar surtos (Fournier PE, Richet H, 2006).

Muitos estudos tem reportado a ocorrência de *A. baumannii* multirresistente (MR) nos hospitais e, em alguns lugares isolados panresistentes têm sido identificados. Numerosos relatos de surtos causados por AbRC têm sido publicados nos últimos anos em diversos países. O contexto epidemiológico-molecular dos surtos de AbRC é bastante complexo. Alguns autores reportam surtos monoclonais associados a um determinante de resistência, enquanto outros descrevem surtos policlonais (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2006; Villegas *et al.*, 2007; Mak *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009).

O relato da disseminação de isolados AbCR tem emergido em diferentes países. Provavelmente o caso melhor descrito e referenciado seja a disseminação internacional dos três clones europeus (European clone (EU) I, II e III) dos quais há relatos em diversas regiões do continente (Coelho *et al.*, 2006; Peleg *et al.*, 2008). Em estudo recentemente publicado, foi identificada a presença dos clones EUI, II e III em países fora do continente Europeu, associados à expressão de enzimas OXA-carbapenemases. No entanto, nenhum isolado foi positivo para a pesquisa de metallo  $\beta$ -lactamases (MBLs). Esses dados revelam o sucesso de alguns isolados de *A. baumannii* na aquisição de mecanismos de resistência constituindo importante desafio para os pacientes e profissionais de saúde (Higgins *et al.*, 2010).

No Brasil, o primeiro surto por AbRC ocorreu em 2003 na cidade de Curitiba, onde a presença de MBL e OXA foi pesquisada e oito isolados foram positivos para o gene *bla*<sub>OXA-23</sub>. Através de métodos de tipagem constatou-se que o surto foi monoclonal e houve disseminação entre os hospitais (Dalla-Costa *et al.*, 2003). Atualmente, isolados de AbRC e surtos causados por essa bactéria têm sido reportados em hospitais de vários locais do país, sendo descritos principalmente no Sul e Sudeste (Carvalho *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011).

Em Porto Alegre, o primeiro isolado de AbRC multirresistente foi relatado em 2004, ocorrendo em um hospital isoladamente e, atualmente é prevalente e endêmico na maioria dos hospitais dessa cidade. Em 2007, ocorreu novo surto por AbRC, em diferentes hospitais e quatro UTIs foram fechadas devido a surtos nos 18 meses seguintes. Neste período, 18 hospitais relataram casos de AbRC, o grupo de Martins *et al.* identificou a disseminação cruzada de um mesmo clone contendo o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> em parte dos hospitais envolvidos. O Departamento de Saúde local estabeleceu uma força tarefa para monitorar os casos de infecções associadas aos cuidados de saúde por AbRC através de um sistema de notificação obrigatória (Martins *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2012).

Infecções por *Acinetobacter* podem demonstrar variação sazonal, e tem sido há muito tempo relatadas em climas quentes e úmidos, que são favoráveis ao crescimento deste patógeno (Gales *et al.*, 2001, Martins *et al.*, 2012), sendo um problema recorrente durante guerras e desastres naturais e causa de surtos multi-hospitalares em climas temperados (Dijkshoorn, 2007; Perez, 2007; Munoz, 2008). Dados do *Center for Disease and Control* (CDC) vêm registrando taxas altas de infecção hospitalar causadas por esse agente, desde 1974 são registradas taxas mais elevadas de infecção hospitalar causadas por esse agente no verão, quando em comparação com as demais estações do ano, podendo esse aumento chegar a 50%, de acordo com relatos do CDC. As possíveis explicações para essa variação incluem o aquecimento e a umidade do ar, que favorecem o crescimento do *Acinetobacter* em seu hábitat natural, e a contaminação de ambientes potencialmente preveníveis, como filtros de ar-condicionado (Munoz *et al.*, 2008).

Estudos têm demonstrado que pacientes infectados e/ou colonizados podem ser os reservatórios de *A. baumannii* MR, e que a principal via de transmissão ocorre

pelas mãos dos profissionais de saúde (Maragakis *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2009). Em um estudo realizado em 2007, Marchaim *et al.* mostrou que os níveis de colonização na pele de profissionais da saúde em ambulatórios eram elevados (25 a 40%), chegando a 75% em pacientes hospitalizados, e colonização da faringe cerca de 7% da população geral, tendo sido também isolado de escarro, urina, fezes e secreções vaginais.

Poucos estudos relatam infecções por *A. baumannii* adquiridas na comunidade indicando baixa prevalência deste patógeno em tais infecções. O *Acinetobacter* spp. pode fazer parte da microbiota transitória da pele, particularmente nas regiões axilares e inguinais, sendo ocasionalmente encontrado na cavidade oral e no trato respiratório de adultos saudáveis, no entanto, a taxa de colonização normalmente é baixa (Dijkshoorn *et al.*, 2007).

Alguns estudos relatando casos de pneumonia comunitária causada por este patógeno, geralmente associam a doença a fatores de pré-disposição dos pacientes tais como: alcoolismo, tabagismo, diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) entre outras (Dijkshoorn *et al.*, 2007; Falagas *et al.*, 2007). Uma revisão sistemática publicada por Falagas *et al.* (2007) demonstrou um índice de mortalidade em torno de 56% em pacientes com pneumonia e/ou bacteremia comunitária por *Acinetobacter* spp.. Neste estudo também foi evidenciado que os casos foram originados da China, Taiwan e Austrália e, os isolados eram em geral sensíveis aos antimicrobianos utilizados na terapêutica.

### **2.3 Resistência aos antimicrobianos em *A. baumannii***

A resistência bacteriana aos antimicrobianos está aumentando sua prevalência no mundo todo. De um modo geral, este aumento reflete a emergência de novos mecanismos de resistência, a transferência epidêmica dos genes de resistência entre as bactérias e a propagação epidêmica das linhagens resistentes entre os pacientes. A importância relativa destes processos varia com a combinação

da espécie e do antimicrobiano, mas cada processo pode ser determinado pela pressão seletiva do uso de antimicrobianos (Livermore DM, Dudley MN, 2000).

O *Acinetobacter* que, até as três últimas décadas, era considerado um microorganismo de patogenicidade questionável e, baixa virulência, emergiu como importante causa de surtos hospitalares no mundo (Fournier PE, Richet H, 2006). Uma das características mais marcantes de *Acinetobacter* é a capacidade de desenvolver resistência a uma série de agentes antimicrobianos (Murray *et al.* 2009), sendo *A. baumannii* considerado capaz de adquirir resistência a virtualmente todas as classes de antimicrobianos existentes (Djkoshoorn *et al.*, 2007; Zavascki *et al.*, 2010).

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

Para alguns antimicrobianos relativamente novos, tais como cefalosporinas de amplo espectro (quarta geração), imipenem, tobramicina, amicacina e fluoroquinolonas, a maioria dos isolados permanecem sensíveis, mas a concentração inibitória mínima (CIM) destes antimicrobianos tem aumentado substancialmente na última década (Tognim *et al.*, 2004).

*A. baumannii* apresenta mecanismos de resistência intrínseca e adquirida, tais mecanismos são similares aos apresentados por *Pseudomonas aeruginosa*, outro BGN de grande relevância no ambiente nosocomial. A elevada plasticidade genética de *A. baumannii* favorece a captação dos genes dos reservatórios ambientais, bem como a hiperexpressão de mecanismos intrínsecos, como bombas de efluxo, e também as suas características celulares como a baixa permeabilidade da membrana externa contribuem para a resistência aos antimicrobianos (Peleg *et al.*, 2008). A resistência a múltiplas drogas geralmente resulta da combinação de

diferentes mecanismos em um único isolado ou da ação de um único e potente mecanismo de resistência (Zavascki *et al.*, 2010), o que explica a resistência emergente entre espécies de *Acinetobacter*.

A disseminação e a emergência da resistência resultam da combinação de múltiplos fatores: mutações dos genes de resistência que aumentam seu espectro de atividade; troca de informações genéticas, nas quais os genes de resistência são transferidos para novos micro-organismos; pressão seletiva exercida pelas condições do meio que favorece a emergência e a disseminação de microorganismos resistentes; proliferação e disseminação de clones multirresistentes (Bertoncheli *et al.*, 2008).

O conceito de multirresistência não é consenso na literatura médica, porém, o mais difundido é a resistência aos carbapenêmicos ou a três ou mais classes de drogas usualmente testadas (Maragakis *et al.*, 2008). Termos como panresistência, extensiva resistência ou extrema resistência também têm sido propostos, mas também não são consenso entre os pesquisadores, assim como a definição precisa de cada termo (Zavascki *et al.*, 2010). Tem-se denominado *A. baumannii* panresistente quando ele apresenta resistência a todas as opções terapêuticas disponíveis, incluindo as polimixinas (Maragakis *et al.*, 2008). No entanto, na literatura há relatos de casos de *A. baumannii* resistente a todos os antimicrobianos, inclusive às polimixinas.

### **2.3.1 Resistência aos carbapenêmicos**

Os carbapenêmicos são antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro e alta potência contra bacilos Gram-negativos, incluindo *A. baumannii*, que geralmente são usados na última linha de defesa contra infecções graves por essa bactéria. Carbapenêmicos como imipenem e meropenem possuem um amplo espectro de atividade e resistem a hidrólise pela maioria das  $\beta$ -lactamases, incluindo *extended spectrum  $\beta$ -lactamases* (ESBLs) e  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC (Jin *et al.*, 2004; Rasmussen & Hoiby, 2006). Até pouco tempo, os carbapenêmicos eram



considerados os antimicrobianos mais ativos contra *A. baumannii*. No entanto, a resistência a esta classe de antimicrobianos tem aumentado na última década e surtos devido a *Acinetobacter* resistente aos carbapenêmicos tem sido reportados no mundo todo, muitas vezes associados ao fenótipo de multirresistência (Higgins *et al.*, 2008).

As carbapenemases representam a família mais versátil de  $\beta$ -lactamases, com um amplo espectro de ação. Formam um grupo fenotípico de enzimas que podem ser definidas como  $\beta$ -lactamases, pertencentes às classes moleculares A (penicilinases), B (metalo- $\beta$ -lactamases) (MBLs), C (cefalosporinases) (AmpC) e D (oxacilinases) (OXAs) (OXA-carbapenemases), segundo a classificação de Ambler (1980). Aquelas pertencentes às classes A, C e D são serina  $\beta$ -lactamases que possuem serina no sítio ativo, aquelas pertencentes a classe B são metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ L) e contêm um ou dois íons zinco no sítio ativo (Jin *et al.*, 2004; Queenan AM, Bush K, 2007). Carbapenemases,  $\beta$ -lactamases com eficiência catalítica para a hidrólise de carbapenêmicos, resultando em CIMs elevadas, incluem enzimas das classes moleculares A, B e D (Queenan AM, Bush K, 2007).

A resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp. é geralmente mediada por carbapenemases do tipo OXA e menos frequentemente por MBLs (Poirel *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2010). A maioria das OXA-carbapenemases confere apenas susceptibilidade reduzida aos carbapenêmicos, mas a associação com mecanismos secundários como à diminuição da permeabilidade da membrana externa (porinas), superexpressão das bombas de efluxo e alteração nas proteínas ligantes de penicilina, pode resultar em altas taxas de resistência (Rasmussen & Hoiby, 2006; Djikshoorn *et al.*, 2007) inclusive a outras classes de antimicrobianos. Em geral, quando a CIM está muito elevada para estes antimicrobianos, diferentes mecanismos de resistência estão envolvidos.

As MBLs são muito importantes clinicamente, pois são resistentes a todos os  $\beta$ -lactâmicos, exceto monobactâmicos (aztreonam). São divididas em sub-classes que são: IMP, VIM, GIM, SPM, AIM, SIM e KHM (Nordmann & Poirel, 2002). Algumas MBLs do tipo VIM e IMP já foram descritas em *Acinetobacter* (Maragakis *et al.*, 2008; Gupta, 2008), a enzima SIM-1 foi descrita na Coreia (Poirel *et al.*, 2006), sendo as do tipo IMP as mais prevalentes em *A. baumannii*. Estas enzimas, embora menos

difundidas do que as OXAs nesta bactéria, são encontradas em elementos genéticos móveis, podendo ser transferidas entre isolados (Maragakis *et al.*, 2008).

As carbapenemases da classe molecular A são raras e estão geralmente mais envolvidas com enterobactérias, sendo raramente inibidas. Carbapenemases da classe A de Ambler (KPC) foram relatadas em *A. baumannii* em Porto Rico por Robledo *et al.*, em 2009.

### **2.3.2 Produção de $\beta$ -lactamases e implicações para a terapia**

Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos – penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos – são os mais utilizados na prática clínica e, esta preferência deve-se a sua eficácia e segurança e pelo fato de sua atividade poder ser estendida e restabelecida por manipulação química. Nenhuma outra classe possui tal maleabilidade e versatilidade química. No entanto, nas últimas décadas, o uso de sucessivas gerações de  $\beta$ -lactâmicos selecionou fortemente sucessivas gerações de enzimas  $\beta$ -lactamases, cada qual mais potente do que a anterior (Livermore & Woodford, 2006).

Enzimas  $\beta$ -lactamases são a principal causa de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (Zavascki *et al.*, 2010). A resistência mediada por  $\beta$ -lactamases é especialmente eficiente entre BGNs, devido ao fato de estas enzimas estarem concentradas no espaço periplasmático e, portanto, serem capazes de destruir os  $\beta$ -lactâmicos antes destes alcançarem os sítios de ligação à penicilina na membrana citoplasmática (Zavascki *et al.*, 2010).

As  $\beta$ -lactamases são enzimas que rompem o anel  $\beta$ -lactâmico inativando o antibiótico. Essas enzimas são classificadas de acordo com sua homologia na sequência de aminoácidos em quatro classes (A-D) (classificação de Ambler) ou de acordo com sua preferência por determinado substrato (classificação de Bush) (Rasmussen BA, Bush K, 1997).

Entre as  $\beta$ -lactamases de maior relevância clínica, destacam-se: CTX-M AmpC, ESBLs e KPC carbapenemases em *Enterobacteriaceae*; OXA-carbapenemases e metalo-carbapenemases principalmente em *Acinetobacter* spp. e outros não-fermentadores (Livermore & Woodford, 2006). Algumas bactérias podem expressar essas enzimas de modo constitutivo, no seu cromossomo, ou adquiri-las através dos fenômenos de conjugação ou recombinação homóloga (Queenan AM, Bush K, 2007).

*Acinetobacter* possui uma ampla variedade de  $\beta$ -lactamases que hidrolisam e conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (Maragakis *et al.*, 2008). *A. baumannii* possui AmpC de origem cromossomal cuja expressão não é induzível e é regulada pela sequência promotora ISAb<sub>a</sub>1 (Zavascki *et al.*, 2010). A hiperexpressão de AmpC confere resistência às cefalosporinas de amplo espectro, entretanto cefepime e carbapenêmicos não são hidrolizados por essa enzima (Peleg *et al.*, 2008). As ESBLs, identificadas primariamente em enterobactérias, são capazes de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro (terceira e quarta gerações) e de baixo espectro, além de penicilinas. Atualmente, o termo ESBL também inclui enzimas das classes A e D, as quais apresentam atividade hidrolítica aos antimicrobianos já citados, além de aztreonam e em alguns casos, carbapenêmicos (Zavascki *et al.*, 2010). Desde os anos 90 há relatos crescentes de ESBL em *A.baumannii* e *P. aeruginosa*, no entanto, a prevalência destas enzimas em *A. baumannii* é ainda pouco conhecida, pois a detecção laboratorial destas enzimas é dificultada pela presença de outros mecanismos como a presença de AmpC que interferem nos testes de ESBL (Giamarellou *et al.*, 2008; Peleg *et al.*, 2008).

Em *A. baumannii* de todas as  $\beta$ -lactamases já identificadas (tabela 2), as carbapenemases adquiridas capazes de hidrolisar os carbapenêmicos, tornaram-se um problema de saúde pública nos últimos anos. Isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos são usualmente resistentes a todas as classes de antimicrobianos, e mostram resistência intermediária a tigeciclina e colistina (Zarrilli *et al.*, 2009).

As carbapenemases adquiridas estão normalmente associadas a plasmídeos, integrons e transposons, estruturas que facilitam a disseminação horizontal destas

enzimas. Além disso, genes de resistência a outros antimicrobianos podem ser encontrados em tais estruturas (Queenan AM, Bush K, 2007).

**Tabela 2.  $\beta$ -lactamases identificadas em *A. baumannii* de acordo com sua classificação funcional e molecular.**

Bush-Jacoby-Medeiros	Ambler	Enzimas
1	C	AmpC(ADC)
2b	A	TEM-1 e -2
2be	A	PER-1 e -2 VEB-1, -1 a e -3
		TEM-92 e -116 SHV-5 e -12 GES-11 CTX-M-2
2c	A	RTG-2 (CARB-5), CARB-8, RTG-4
2d	D	Curto espectro: OXA-2, -20, -21 e -37 Carbapenemase-ocorrência natural: OXA-51-like (OXA-64-66, OXA-68-71, OXA-78-80, OXA-82, OXA-86, OXA-92 e OXA-104-112 Carbapenemase-adquirida: OXA-23 (ARI-1), -24/40, -25-27, -43, -49, -58, -72, -96, -97, -143****
3	B	IMP-1, -2, -4, -6, -8 e -11 VIM-1, -4 e -11 SIM-1

2f	A	NDM-1** ***KPC-2, -3, -4, -10
----	---	----------------------------------

**\*Adaptado de Zavascki *et al.* 2010;**

**\*\*Robledo *et al.* 2009;**

**\*\*\*Karthikeyam *et al.* 2010;**

**\*\*\*\* Higgins *et al.* 2009**

### 2.3.3 Oxacilinases (OXA-carbapenemases)

Oxacilinases são enzimas pertencentes à classe molecular D de Ambler e destas, a maioria pertence ao grupo 2d da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros proposta em 1995 (Poirel *et al.*, 2010). Sua denominação está associada à capacidade de hidrolisar a oxacilina como substrato preferencial (Rasmussen & Hoiby, 2006). Hidrolisam também amoxicilina, metilcilina, cefaloridina e cefalotina. Estas enzimas são caracterizadas por uma grande diversidade, tanto genética quanto no espectro de hidrólise aos beta-lactâmicos (Poirel *et al.*, 2010).

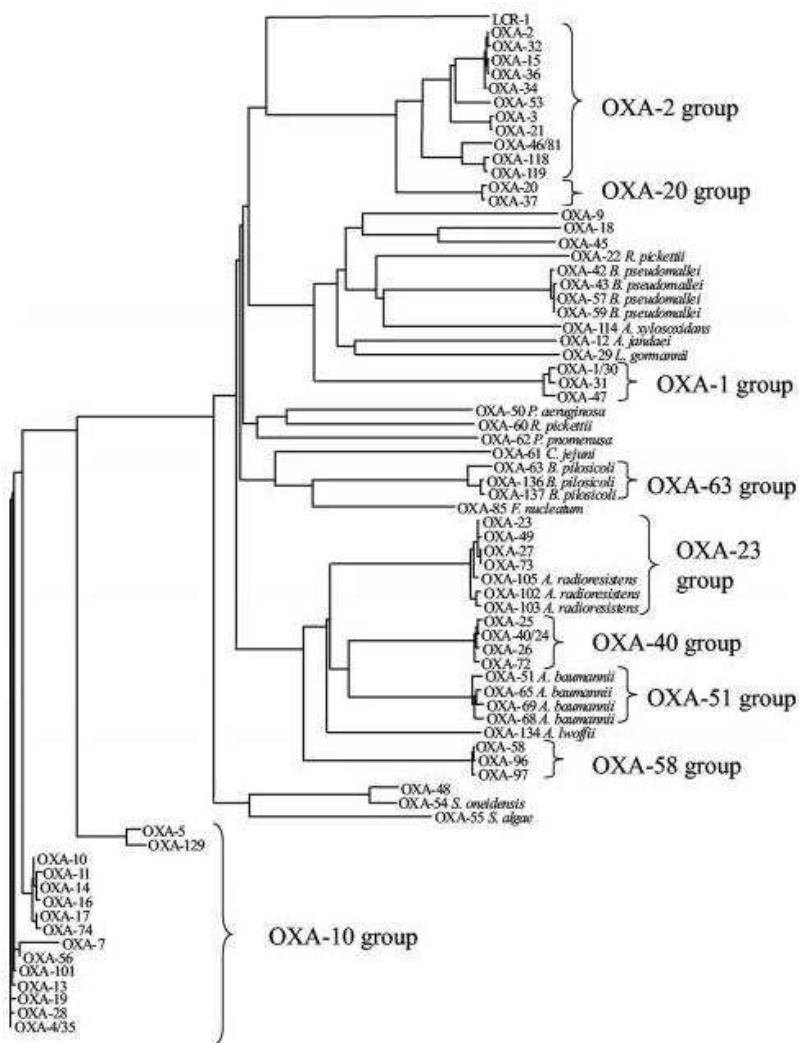
OXA-carbapenemases podem ser intrínsecas ou adquiridas, sendo estas últimas cromossomais ou encontradas em plasmídeos (Poirel & Nordman, 2006). Apesar de a maioria dos genes de OXA-carbapenemases estarem inseridos em integrons de classe 1, relatos recentes têm indicado que outras estruturas genéticas específicas, incluindo sequências de inserção e transposons, podem estar associados com estes genes (Poirel *et al.*, 2010; Turton *et al.*, 2006; Corvec *et al.* 2007; Chen, 2008). Muitos genes de oxacilinases têm sido identificados como fonte de resistência adquirida em bactérias gram-negativas, mas estudos recentes demonstram que estes genes ocorrem naturalmente em patógenos significantes como *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Turton *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2010).

As enzimas do tipo OXA-carbapenemases hidrolisam fracamente os carbapenêmicos e nem sempre demonstram um perfil de resistência, no entanto,

quando associadas a sequências de inserção, as quais carregam promotores fortes, podem ter um aumento em sua expressão e demonstrar elevada resistência a estes antimicrobianos (Turton *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2009; Higgins *et al.*, 2010). Além disso, a baixa permeabilidade da membrana externa contribui fortemente para a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* (Higgins *et al.*, 2010).

Oxacilinas com atividade de carbapenemase são geralmente encontradas em *Acinetobacter spp.*, no entanto há um aumento de relatos de enterobactérias, em particular *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases da classe D (Rasmussen & Hoiby, 2006; Higgins *et al.*, 2010; Poirel *et al.*, 2010; Walsh, 2010). A disseminação de *Acinetobacter* produtor de carbapenemases parece estar ligada a disseminação de alguns clones (Zhou, 2007, Stoeva, 2008, Walsh, 2010), em contraste com carbapenemases da classe D em *Enterobacteriaceae*, que são disseminadas de uma cepa para outra via plasmídeos (Carrer, 2010; Walsh, 2010).

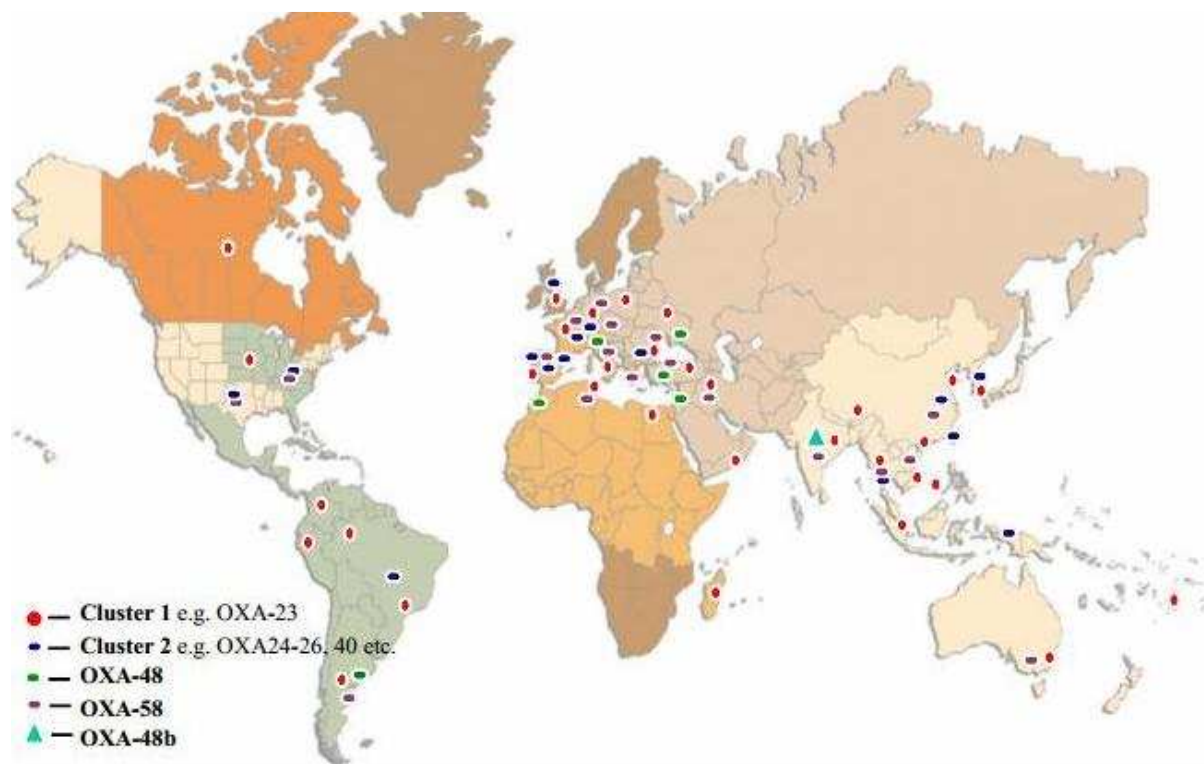
Em torno de 160 variantes de OXAs já foram descritas, muitas delas são derivadas das OXA-2, OXA-3, OXA-10 identificadas principalmente em *P. aeruginosa*. A árvore filogenética das OXA-carbapenemases apresenta nove subgrupos, com base na sequência de aminoácidos e similaridade genética (Rasmussen & Hoiby, 2006; Poirel *et al.*, 2010) (figura 1). Os subtipos de OXA que possuem elevada similaridade genética fazem parte de um mesmo subgrupo filogenético. Em *A. baumannii*, até o momento, cinco subgrupos de OXA já foram descritos: OXA-51, OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 e OXA-143 (Higgins *et al.*, 2010).



**Figura 1. Principais subgrupos filogenéticos de OXA-carbapenemases.**

**Fonte:** Poirel *et al.* 2010.

O grupo OXA-23 inclui enzimas mediadas por cromossomos ou plasmídeos, tem sido reportado no mundo todo, sendo particularmente proeminente em algumas regiões geográficas como Ásia, América Latina e Europa onde há relatos recentes de disseminação clonal (Walsh, 2010) (figura 2). No Brasil, a OXA-23-like e a MBL IMP-1-like são as carbapenemases mais descritas (Sader *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2009; Mostachio, 2012).



**Figura 2. Distribuição global dos principais grupos de OXA-carbapenemases.** Grupos menores (OXA-72 e OXA-143) não foram mostrados.

\*Adaptado de Walsh, 2010.

A primeira descrição de OXA-23 em *A. baumannii*, no Brasil, foi em 2003 relacionada a um surto na cidade de Curitiba (Dalla-Costa *et al.*, 2003). Após o primeiro relato, não houve mais nenhuma descrição na literatura até o ano de 2009, quando foi descrita a disseminação de diferentes clones produtores de OXA-23 no Rio de Janeiro (Carvalho *et al.*, 2009). Também em 2009, na cidade de Porto Alegre, a presença de *A. baumannii* produtor de OXA-23, foi relatada em um estudo realizado por Martins *et al.* e demonstrou a transmissão de um clone resistente aos carbapenêmicos entre equipamentos médicos e pacientes, e entre profissionais de saúde. Outro estudo recente publicado por Ferreira *et al.* em 2011, verificou a disseminação clonal dos isolados de *Acinetobacter* spp. OXA-23 positivos entre hospitais em Porto Alegre. Atualmente a carbapenemase OXA-23 encontra-se amplamente disseminada no Brasil (Carvalho *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009; Werneck *et al.*, 2011) e no mundo.



O grupo OXA24/40 pode ser mediado por cromossomos ou plasmídeos, e parece ser menos disseminado do que as enzimas OXA-23-like (Zavascki *et al.*, 2010). Já foram reportadas enzimas pertencentes a este grupo, como OXA-24/40 na Europa e nos Estados Unidos, e as OXAs -25 e -26 restritas a Europa (Zavascki *et al.*, 2010). OXA-33 já foi identificada em *A. baumannii* em Portugal e OXA-72 na Ásia (Zavascki *et al.*, 2010; Poirel *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011) e Europa (Barnaud, 2010; Franolić-Kukina *et al.*, 2011) e, recentemente um relato de OXA-72 em *A. baumannii* no Brasil (Werneck *et al.*, 2011).

A carbapenemase OXA-58 foi descrita pela primeira vez na França, em 2003 (Poirel *et al.*, 2005) e desde então tem sido reportada em diferentes regiões do mundo. As enzimas OXA-58-like são mediadas exclusivamente por plasmídeos e em *Acinetobacter* também já foram relatadas em diferentes países (Coelho *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2010; Zavascki *et al.*, 2010) em especial na Europa aonde tem sido amplamente disseminadas (Pournaras *et al.*, 2006). As variantes OXA-96 e -97 já foram relatadas em *A. baumannii* em Cingapura e na Tunísia, respectivamente (Koh *et al.*, 2007; Poirel *et al.*, 2008; Zavascki *et al.*, 2010). Na América do Sul, a presença do gene *bla*<sub>OXA-58</sub> foi descrita na Argentina, geralmente associada com resistência aos carbapenêmicos em surtos por *Acinetobacter spp.* (Coelho *et al.*, 2006; Peleg *et al.*, 2008; Gusatti *et al.*, 2012). No Brasil, a ocorrência de *A. baumannii* portador de OXA-58 foi reportada pela primeira vez em 2012, em um estudo realizado por Gusatti *et al.* com isolados clínicos. Neste estudo, apenas um isolado foi positivo para OXA-58, sendo positivo também para OXA-51 e OXA-65, além disso, foi avaliada a presença da sequência IS<sub>Aba1</sub> *upstream* aos genes das oxacilinases e resistência elevada a imipenem foi observada.

A OXA-143 é considerada uma classe de oxacilinase mais recente, e sua prevalência é ainda pouco conhecida, no entanto tem adquirido importância clínica (Walsh, 2010). Em 2009 Higgins *et al.* reportaram pela primeira vez a ocorrência de OXA-143 em um isolado AbRC de 2004, no Brasil. Esta enzima demonstrou 88% de identidade na sequência de aminoácidos com a OXA-40, 63% de identidade com a OXA-23, e 52% de identidade com a OXA-58. Outros estudos reportaram alta prevalência de OXA-143 em isolados de *A. baumannii*, em São Paulo, no Brasil (Antonio *et al.*, 2011; Mostachio *et al.*, 2012). Um estudo realizado por Werneck *et al.*

em 2011, revelou baixa prevalência desta carbapenemase em hospitais de São Paulo e do Rio de Janeiro, no entanto houve alta prevalência de OXA-23 neste estudo. No Rio Grande do Sul, até o momento, não foi relatada a ocorrência de isolados de *Acinetobacter* positivos para OXA-143.

O subgrupo OXA-51 difere dos demais, pois apresenta enzimas de ocorrência natural (intrínseca) em *A. baumannii* ocorrendo na maioria ou em todas as cepas, sendo o gene *bla*<sub>OXA-51</sub> utilizado para identificação molecular a nível de espécie (Heritier *et al.*, 2005; Poirel & Nordmann, 2006; Rassmussen & Hoiby, 2006; Turton *et al.*, 2006). No entanto, há a descrição deste gene em outras espécies como a genoespécie 13TU (Lee *et al.*, 2009; Lee, 2012) cujo contexto genético sugere que originou-se de *A. baumannii*. Entretanto, esta espécie é pouco prevalente em isolados clínicos. Em torno de 45 variantes de OXA-51 já foram descritas em *A. baumannii* (Zavascki *et al.*, 2010).

A maioria dos estudos relatam a ocorrência de carbapenemases do tipo OXA em isolados de *A. baumannii*, positivos para o gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, reportam também a prevalência destas enzimas no gênero *Acinetobacter*. No entanto, outras espécies de *Acinetobacter* podem possuir OXA-carbapenemases constitutivas ou não (Poirel *et al.*, 2008; Turton *et al.*, 2012), embora algumas não tenham a mesma relevância clínica de *A. baumannii*. A ocorrência das OXA-carbapenemases também não é restrita ao gênero *Acinetobacter* (Bonnet *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2010; Zavascki *et al.*, 2010), sendo muito frequentes também em *P. aeruginosa*, outro BGN de grande importância clínica, como citado anteriormente.

## 2.4 Tipagem molecular

A tipagem molecular é uma ferramenta importante que auxilia no entendimento da epidemiologia de surtos, pois estabelece o grau de similaridade entre diferentes isolados clínicos. Além de auxiliar na detecção de surtos, auxilia também na identificação de transmissão cruzada e de fontes de infecção, bem como

no monitoramento e controle da infecção hospitalar. A função da tipagem molecular é determinar se organismos epidemiologicamente relacionados são também geneticamente relacionados (Singh *et al.*, 2006).

Os sistemas de tipagem devem ser selecionados com base em seu poder discriminatório, reprodutibilidade e facilidade de interpretação e uso. Uma característica do organismo alvo que apresente relativa estabilidade e diversidade adequada dentro da espécie deve ser critério para escolha do método (Westbrook & Holmes, 2004).

Os métodos de tipagem podem ser enquadrados em duas grandes categorias: métodos fenotípicos e métodos moleculares (genotípicos ou não). A tipagem fenotípica baseia-se nas características expressas pela bactéria, as quais por envolverem expressão genética tendem a ser variáveis, com base em mudanças nas condições e fases do crescimento, além de mutações espontâneas (Tenover *et al.*, 1997).

Os métodos genotípicos baseiam-se na análise da estrutura genética de um organismo e verificação de polimorfismo nos padrões de restrição do DNA. Quando clivados com enzimas de restrição, produzem fragmentos em número e tamanho variados, que separados por eletroforese formam um perfil de segmentos o qual pode ser comparado entre amostras diferentes. Os métodos genotípicos são menos sujeitos a variação natural, apesar de serem afetados por inserções ou deleções de DNA no cromossomo, por ganho ou perda de DNA extracromossômico, ou por mutações ao acaso que podem criar ou eliminar sítios de restrição para as endonucleases (Tenover *et al.*, 1997).

A tipagem molecular de microrganismos caracteriza os isolados microbianos em nível molecular para encontrar eventuais semelhanças entre amostras, caracterizando sua origem evolucionária comum. Um clone é definido como um conjunto de amostras bacterianas geneticamente relacionadas que são indistintas umas das outras por métodos de tipagem molecular, ou amostras tão similares que presume-se serem derivadas de um ancestral comum (Tenover *et al.*, 1995). Em geral cepas com 100% de similaridade genética são consideradas indistinguíveis e cepas com mais de 80% de similaridade genética são consideradas relacionadas e

as cepas com similaridade genética menor a 80% são consideradas distintas (Singh *et al.*, 2006).

Diversos métodos genotípicos têm sido desenvolvidos para a tipagem de *Acinetobacter*, incluindo ribotipagem, análise de macrorestrição seguida de PFGE, *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polimorfism* (AFLP) (Seifert, 2005), *Repetitive Element Palindromic PCR* (REP-PCR). Dentre estes métodos, o PFGE é considerado “padrão-ouro” da tipagem epidemiológica (Durmaz *et al.*, 2009).

A técnica de PFGE foi desenvolvida em 1984 por Schwartz e Cantor, para permitir o fracionamento de moléculas grandes de DNA, o que não era possível através de métodos convencionais de eletroforese (Hershleb *et al.*, 2007). Em comparação com outros métodos, o PFGE tem excelente aplicação quanto aos tipos de microrganismos a serem testados e, excelente reprodutibilidade e poder discriminatório (Westbrook & Holmes, 2004).

Muitos estudos tem utilizado a técnica de PFGE ou outras técnicas de tipagem durante a investigação epidemiológica de AbRC e também para definir a relação genética entre isolados provenientes de diferentes cidades e países (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2006; Lolans *et al.*, 2006; Mugnier *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2009).

A análise de isolados multirresistentes por meio de técnicas moleculares de tipagem é essencial para a investigação de surtos. Quando a análise por tipagem molecular demonstra que a maioria dos isolados analisados apresenta o mesmo perfil subentende-se que um mesmo clone está se disseminando, portanto, é necessário adotar medidas de barreira adequadas de modo a impedir a transmissão do patógeno entre pacientes, entre o profissional de saúde e os pacientes e também entre hospitais.

## 2.5 Medidas de controle de infecção

Dadas altas taxas de resistência associadas à *A. baumannii*, o papel de prevenir a disseminação deste patógeno entre pacientes é prioritário. O controle das infecções causadas por esta bactéria é desafiador devido à ampla variedade de mecanismos de resistência que possui e, por sua capacidade de desenvolver rapidamente novos mecanismos de resistência (Murray *et al.*, 2009).

A emergência de AbRC causador de infecções nosocomias tornou-se uma preocupação mundial. Relatos de surtos tem demonstrado que este patógeno detém a capacidade de permanecer viável no ambiente por longos períodos, mesmo em condições adversas, sendo este fator determinante para a transmissão e disseminação cruzada entre pacientes (Karageorgopoulos *et al.*, 2008).

De modo geral, o surgimento de AbRC em unidades hospitalares pode ser devido: à colonização de um paciente, à pressão seletiva pelo uso prévio de terapia antimicrobiana, à admissão de um paciente previamente colonizado por um isolado AbRC. Sendo geralmente a transmissão cruzada a dinâmica de disseminação (Dijkshoorn *et al.*, 2007). No ambiente hospitalar, a persistência e a transmissão de isolados multirresistentes é determinada por fatores como: vulnerabilidade dos pacientes, pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos, potencial de aumento da disseminação por um grande número de pacientes colonizados e/ou infectados (pressão de colonização), esforços organizacionais despendidos e impacto na implementação e adesão dos profissionais às medidas recomendadas (Siegel *et al.*, 2007).

Medidas de controle de infecção, tais como culturas de vigilância, precauções no contato com pacientes colonizados/infectados; agrupamentos em *coorte*, identificação da fonte de infecção, controle do ambiente, já demonstraram ser eficientes em alguns casos (Urban *et al.*, 2003; Fournier PE, Richet H, 2006; Munoz *et al.*, 2008).

O sucesso no gerenciamento das infecções envolve a cooperação dos profissionais de saúde, de todos os níveis. Deste modo, medidas administrativas

para organizar um time efetivo capaz de providenciar informações regulares a respeito de um surto, são fundamentais (Karageorgopoulos *et al.*, 2008). Um resumo das medidas de prevenção e controle de infecções por *A. baumannii* MR são apresentados na tabela 3.

Somada a transmissão, a emergência da resistência ocorre no contexto da pressão seletiva exercida pela terapia antimicrobiana de amplo-espectro, tais como a terapia envolvendo carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração (Kim *et al.*, 2008). Terapêutica adequada pode ser a única variável modificável capaz de influir benéficamente no desfecho clínico de pacientes com infecções por patógenos multirresistentes, de modo a evitar a emergência da resistência. Em muitas situações, isolados de *A. baumannii* multirresistentes, incluindo resistência aos carbapenêmicos, são somente sensíveis às polimixinas. Devido ao fato de as opções terapêuticas serem limitadas nos casos de infecção por *A. baumannii* MR, a descoberta e o desenvolvimento de novas terapias, controle e escolha adequada dos regimes antimicrobianos existentes e terapias combinadas, além de maior controle na transmissão associada de isolados multirresistentes faz-se necessário (Maragakis *et al.*, 2008).

**Tabela 3. Métodos para o controle e prevenção de infecção por *A. baumannii* multiresistente.**

<b>Métodos</b>	<b>Comentários</b>
Controle da fonte de infecção	Efetivo quando a fonte de um surto é identificada
Medidas de precaução padrão	Inclui: higienização das mãos, uso correto e consistente de luvas, vestimenta apropriada e proteção dos olhos
Prevenção do contato	Inclui: equipamentos exclusivos ao cuidado do paciente, vestimenta e luvas para os profissionais de saúde entrarem em salas de isolamento

Limpeza e desinfecção do ambiente	Ampla disseminação da contaminação ambiental é geralmente relatada no cenário epidêmico, e reservatórios ambientais parecem contribuir para o cenário endêmico
Agrupamento em <i>coorte</i> dos pacientes	Agrupando pacientes colonizados e infectados pelo mesmo microorganismo em uma unidade ou parte de uma unidade
Agrupamento em <i>coorte</i> dos profissionais de saúde	Designar equipes para o cuidado exclusivo de pacientes colonizados e infectados pelo mesmo microorganismo
Fechamento da unidade clínica	Necessário em surtos para interromper a transmissão e permitir desinfecção efetiva do ambiente
Controle do uso de terapia antimicrobiana	Programas para promover o uso sensato de antimicrobianos e prevenir a emergência da resistência
Vigilância	Vigilância passiva ou ativa podem identificar pacientes colonizados ou infectados a tempo de medidas serem implementadas

**\*Adaptado de Maragakis *et al.* (2008)**

## 2.6 Opções terapêuticas no tratamento de AbRC

Os carbapenêmicos permanecem como o tratamento de escolha quando os isolados apresentam susceptibilidade a esta classe de antimicrobianos (Maragakis *et al.*, 2008). No entanto, a resistência aos carbapenêmicos tem emergido e muitas vezes associada a um fenótipo de multirresistência (Higgins *et al.*, 2008), apesar de as definições de multirresistência variarem na literatura. Atualmente, *A. baumannii* multirresistente é um dos BGNs mais difícil de se controlar e tratar (Zavascki *et al.*, 2010).

### 2.6.1 Polimixinas

A emergência de infecções causadas por BGNs multirresistentes, levou ao resgate das polimixinas como opção terapêutica. Estas drogas foram descobertas em 1945 e consistem de cinco compostos químicos diferentes (A-E) (Guiamarellou *et al.*, 2008). Seu mecanismo de ação consiste em desestabilizar as membranas externa e citoplasmática bacterianas, aumentando a permeabilidade e levando à rápida morte por extravasamento do conteúdo celular (Maragakis *et al.*, 2008; Zavascki *et al.*, 2010). Este efeito é concentração dependente.

Das cinco polimixinas conhecidas, apenas a B e a E (colistina) estão disponíveis para o uso clínico, sendo a colistina a mais utilizada, e sendo a maioria das pesquisas voltadas para esta polimixina.

Devido ao debate sobre toxicidade causada por estas drogas, principalmente nefrotoxicidade e neurotoxicidade, as polimixinas tiveram seu uso restrito no início dos anos 1980, exceto para o tratamento de fibrose cística (Zavascki *et al.*, 2008). No entanto, devido às opções terapêuticas limitadas, polimixina B e colistina tiveram seu uso resgatado principalmente para o combate de infecções por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes (Zavascki *et al.*, 2010).



O conhecimento sobre a farmacodinâmica e farmacocinética das polimixinas até pouco tempo era muito limitado, no entanto, estudos mais confiáveis foram publicados recentemente, e também estudos que demonstram a segurança e eficácia destes agentes na terapia contra *A. baumannii* MR (Zavascki *et al.*, 2007; Landman *et al.*, 2008; Zavascki *et al.*, 2008; Plachouras *et al.*, 2009; Zavascki *et al.*, 2010).

Estudos observacionais relataram resposta clínica favorável entre 57-90% entre pacientes com infecções por *Acinetobacter* MR, incluindo pneumonia, bacteremia, septicemia, infecção intra-abdominal, e infecções do SNC (Garnacho-Montero *et al.*, 2003; Holloway *et al.*, 2006; Kallel *et al.*, 2006; Falagas *et al.*, 2007; Maragakis *et al.*, 2008).

Alguns estudos desmistificaram o grande problema associado à nefrotoxicidade, mostrando que este efeito parece ser bem controlado quando o fármaco é administrado em doses adequadas (Garnacho *et al.*, 2003; Garnacho-Montero *et al.*, 2003).

Resistência às polimixinas já foi relatada, possivelmente como um resultado de alterações nas proteínas de membrana externa, e mecanismos de efluxo (Maragakis *et al.*, 2008). No entanto, a resistência a colistina é rara, a heteroresistência é um fenômeno que já foi descrito *in vitro* em *Acinetobacter*, principalmente em hospitais da Coreia, algumas vezes associado com a colistina (Li *et al.*, 2006; Yau *et al.* 2009; Zavascki *et al.*, 2010). Owen *et al.* (2007) observaram o fenótipo de heteroresistência sugerindo que a terapia combinada poderia evitar a emergência de resistência durante o tratamento. Até o momento a heteroresistência não foi demonstrada *in vivo* (Zavascki *et al.*, 2009; Zavascki *et al.*, 2010), no entanto, seu impacto necessita ser melhor estudado a nível clínico.

Embora as polimixinas sejam, atualmente as melhores opções terapêuticas para o tratamento no caso de infecções por AbRC e multirresistente, ainda pouco se sabe sobre seus efeitos clínicos, portanto, são necessários estudos clínicos que retratem a segurança na sua utilização, bem como estudos que avaliem a estratégia de terapia antimicrobiana combinada.

## 2.6.2 Tigeciclina

A tigeciclina, primeiro agente da classe das glicilciclinas, é derivada da minociclina que foi aprovada para uso pelo FDA em 2005, para o tratamento de infecções nos tecidos moles e intra-abdominais, é um dos poucos antimicrobianos novos com atividade contra BGNs (Livermore DM, 2005) incluindo *Acinetobacter* (Giamarellou *et al.*, 2008). Esta droga age inibindo a tradução (síntese proteica) bacteriana, pois liga-se à subunidade 30S ribossomal, impedindo a incorporação de resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica (Zavascki *et al.*, 2010).

Possui um amplo espectro de ação, incluindo microorganismos multirresistentes como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, BGNs produtores de enzimas  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado e *A. baumannii*. No entanto não é ativa contra espécies de *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *P. aeruginosa* (Peterson *et al.*, 2008; Bhattacharya *et al.*, 2009).

A tigeciclina possui atividade bacteriostática e é capaz de evadir o principal mecanismo de resistência a tetraciclinas, determinado pela aquisição dos genes *tet*, os quais codificam bombas de efluxo que expõem tetraciclinas da célula (e.g., *tetA-E*, *tetG-L*) e proteínas que protegem o ribossomo (e.g., *tetM*, *tetO*). Além disso, a tigeciclina não é afetada pela maioria dos mecanismos comuns de resistência a antimicrobianos usados pelas bactérias (Peterson *et al.*, 2008).

Um número crescente de estudos tem sido publicados indicando que a tigeciclina pode ser uma boa opção terapêutica para *A. baumannii* MR, no entanto ainda há controvérsias sobre sua indicação: a tigeciclina não possui ponto de corte estabelecido pelo CLSI, nem para *Enterobacteriaceae* e nem para *Acinetobacter* spp. (Peterson *et al.*, 2008; Zavascki *et al.*, 2010; CLSI, 2011). Para *Enterobacteriaceae*, os pontos de corte têm se mostrado discordantes, o *Food and Drug Administration* (FDA) considera susceptibilidade CIMs  $\leq 2\mu\text{g/mL}$  e resistência CIMs  $\geq 4\mu\text{g/mL}$  (U.S. FDA), enquanto o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) considera susceptibilidade à tigeciclina CIMs  $\leq 1\mu\text{g/mL}$  e resistência CIMs  $\geq 2\mu\text{g/mL}$  (EUCAST *clinical breakpoints v 2.0*). Há a necessidade de confirmação por microdiluição quando a CIM por E-test for maior ou

igual a 2µg/mL, no entanto, existem complicações na determinação das CIMs por E-test e disco difusão, demonstrando resultados discrepantes em comparação com a microdiluição em caldo, muitas vezes demonstrando falsa resistência à tigeciclina (Casal *et al.*, 2009; Zavascki *et al.*, 2010). Somado à isso estudos farmacocinéticos demonstram que a concentração sérica de tigeciclina, nas doses usualmente recomendadas, está abaixo do indicado para o tratamento de micro-organismos com CIMs de 1-2µg/mL (Peterson *et al.*, 2008).

A determinação do grau de susceptibilidade à tigeciclina por muitos laboratórios clínicos pode ser complicada, levando a falsos resultados, o que afeta na decisão do clínico na hora de prescrever esta droga (Zavascki *et al.*, 2010).

Atualmente, a tigeciclina representa apenas uma alternativa para o tratamento de *A. baumannii* MR em pacientes incapazes de tolerar polimixinas ou para isolados resistentes às polimixinas. O uso de doses mais altas do que as usualmente recomendadas, deve ser considerado especialmente em CIMs de 1-2µg/mL, em infecções no sangue, pulmões e urina. No entanto, estudos sobre a farmacocinética e ensaios clínicos capazes de estimar corretamente regimes de altas doses desta droga são necessários para confirmar tais recomendações (Zavascki *et al.*, 2010) e averiguar sua eficácia.

### **2.6.3 Ampicilina-sulbactama**

Alguns inibidores de beta-lactamases, particularmente sulbactama, têm atividade intrínseca contra algumas cepas de *Acinetobacter* spp., porém monoterapia com sulbactama não é recomendada para infecções severas por este patógeno (Maragakis *et al.*, 2008).

Apesar de o tratamento combinado com ampicilina/sulbactama em infecções pouco severas causadas por isolados resistentes aos carbapenêmicos já ter demonstrado sucesso (Levin *et al.*, 2003), alguns estudos revelam que a combinação do agente β-lactâmico (e.g., ampicilina) com o agente inibidor não

parece contribuir para maior atividade ou sinergismo (Higgins *et al.*, 2004; Brauers *et al.*, 2005; Maragakis *et al.*, 2008).

Além disso, o resultado de testes de susceptibilidade como E-test e disco-difusão, devem ser interpretados com cautela, para combinações a concentrações fixas de  $\beta$ -lactâmico/inibidor, pois podem indicar falsa susceptibilidade (Higgins *et al.*, 2004; Maragakis *et al.*, 2008).

Embora ainda exista uma lacuna a ser preenchida em relação à dose e ao modo de administração, em isolados que demonstram susceptibilidade, a ampicilina-sulbactama demonstra ser uma opção terapêutica segura e eficaz (Gordon *et al.*, 2010).

### 3 JUSTIFICATIVA

Considerando a emergência da resistência aos antimicrobianos no mundo todo, devido ao uso exacerbado desses agentes somado a outros fatores. Sendo *A. baumannii* um patógeno nosocomial bem sucedido, com características únicas entre as bactérias Gram-negativas, e cuja prevalência como agente infeccioso, resistente a maioria dos antimicrobianos disponíveis, vem aumentando nas últimas décadas. Um estudo que informe o perfil de resistência aos carbapenêmicos e a epidemiologia molecular de isolados multirresistentes e resistentes aos carbapenêmicos, na cidade de Porto Alegre, é de grande importância para determinar a maneira como tais isolados estão se disseminando e assim, auxiliar na prevenção e manejo de infecções causadas por este patógeno.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar a epidemiologia molecular e distribuição de amostras de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, isoladas em três hospitais na cidade de Porto Alegre.

### 4.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos mais utilizados na prática clínica por meio da concentração inibitória mínima (CIM);
2. Pesquisar a presença dos principais genes que codificam OXA-carbapenemases prevalentes em *Acinetobacter* spp.: *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> e *bla*<sub>OXA-143-like</sub> nos isolados clínicos;
3. Caracterizar isolados de *A. baumannii* através da tipagem molecular por PFGE.
4. Investigar a disseminação clonal das amostras de AbRC em três hospitais de Porto Alegre.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Hospitais estudados

*Acinetobacter* spp. foi isolado de amostras clínicas provenientes de três hospitais (1, 2, e 3) de Porto Alegre, no período de março a dezembro de 2011. O hospital 1 ocupa uma área de 128,338 m<sup>2</sup>, sua capacidade abrange 795 leitos, sendo 672 de internação, 67 de terapia intensiva e 56 de emergência. O hospital 2 é um hospital geral de natureza filantrópica, que ocupa uma área de 49,000 m<sup>2</sup>, sua capacidade abrange 603 leitos, sendo 516 de internação e emergência e 87 de terapia intensiva. O hospital 3 é um hospital voltado e equipado para pacientes críticos, possui 139 leitos, sendo 30% de UTI, um número muito acima da média dos hospitais em geral. Realiza mais de 900 atendimentos diários e 360 mil atendimentos por ano em diversas especialidades, em seus 9,500 m<sup>2</sup> de área instalada.

#### 5.1.1 Isolamento e identificação das amostras

Os 132 isolados de *Acinetobacter* spp. estudados foram previamente identificados nas seções de bacteriologia em cada hospital, por métodos bioquímicos ou automatizados, no período acima citado. Os isolados foram armazenados em tubos *ependorf* contendo caldo glicerol 16%, em freezer -80°C até o uso para experimentos. Tendo sido apenas um isolado por paciente incluído neste estudo.

## 5.2 Testes de Susceptibilidade

A avaliação da atividade antimicrobiana, para todos os isolados, foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. Os isolados foram classificados como sensíveis ou resistentes de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (2011) para cada antimicrobiano testado. Os antimicrobianos testados são descritos na tabela 4.

**Tabela 4- Antimicrobianos testados, concentração das soluções padrão e intervalo das concentrações utilizadas para *Acinetobacter* spp.**

Antimicrobiano	Solução padrão µg/mL	Concentrações µg/mL
Amicacina	1024	1,0-512
Ampicilina/sulbactam	512	0,5-256
Cefepima	1024	1,0-512
Ciprofloxacina	128	0,125-64
Imipenem	512	0,5-256
Meropenem	1024	1,0-512
Polimixina B	128	0,125-64
Tigeciclina	32	0,03-16

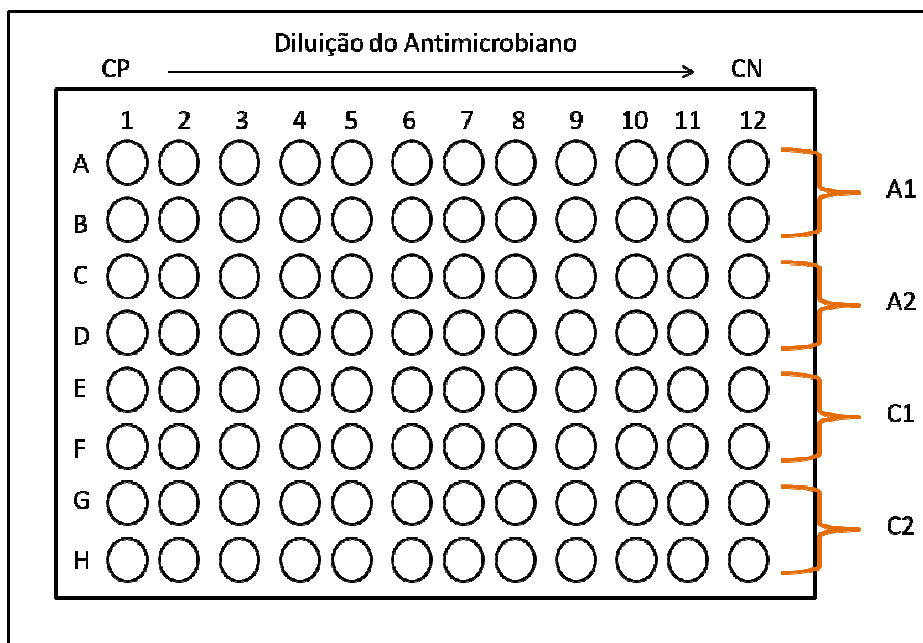


### 5.2.1 Microdiluição em Placa

O teste de microdiluição em placa é uma adaptação do teste de macrodiluição e é considerado o teste “padrão-ouro” para determinação da CIM.

O inóculo bacteriano de cada isolado foi preparado a partir de uma suspensão direta em solução salina, sendo ajustado ao padrão MacFarland 0,5 correspondente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, a partir de colônias isoladas selecionadas de uma placa de ágar de 18 a 24 horas.

Foram utilizadas placas de ELISA estéreis com 96 poços e fundo em “U” para melhor visualização do crescimento bacteriano. Em toda a placa são pipetados 50  $\mu$ L de caldo Müller-Hinton (MH) cátion ajustado, com exceção da última coluna (coluna 12) que é utilizada como controle negativo e contém 100  $\mu$ L de caldo MH. A primeira coluna da placa foi utilizada como controle positivo, onde foram pipetados em caldo MH 50 $\mu$ L do inóculo em cada poço. Nas demais colunas os inóculos foram pipetados em duplicata (duas linhas por inóculo), pipetando-se 50  $\mu$ L em cada poço, da segunda até a décima primeira coluna, em diluições prévias dos antimicrobianos no caldo MH (figura 3). As placas foram incubadas a 37°C entre 18 e 22 horas.



**Figura 3. Organização da placa de microdiluição.** A coluna 1 corresponde ao controle positivo (CP). A coluna 12 corresponde ao controle negativo (CN). Os inóculos de *Acinetobacter* spp. foram testados em duplicata, das colunas 2 a 11. A1 e A2 referem-se às amostras de *Acinetobacter* spp. testadas em duplicata e C1 e C2 referem-se aos controles dos antimicrobiano também testados em duplicata.

### 5.2.2 Determinação da CIM

A CIM foi interpretada após a incubação da placa, a 37°C de 18 a 22 horas, por inspeção visual e confirmação através da leitura das absorbâncias de cada orifício da placa de ELISA.

Para a tigeciclina, como não há um ponto de corte estabelecido pelo CLSI, nem para *Acinetobacter* spp, nem para *Enterobacteriaceae*, utilizou-se o ponto de corte do U.S. FDA para *Enterobacteriaceae*, para os demais antimicrobianos testados, as CIMs foram interpretadas de acordo com o CLSI 2011.

### 5.2.3 Controle de Qualidade

Para o controle de qualidade do teste de susceptibilidade foram utilizadas cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) seguindo critérios estabelecidos pelo CLSI (2011), para cada antibiótico testado.

### 5.3 Análise dos mecanismos de resistência

A análise dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos foi realizada através da pesquisa dos genes codificantes das OXA-carbapenemases prevalentes em *Acinetobacter* spp.: *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> e *bla*<sub>OXA-143-like</sub>, através da reação de PCR multiplex.

A técnica de PCR multiplex consiste na utilização de dois ou mais oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para diferentes sequências gênicas, portanto, capaz de amplificar mais de uma sequência gênica de interesse por reação. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos (tabela 5), e as condições de termociclagem foram descritos por Woodford *et al.*, 2006.

**Tabela 5. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados nesse estudo para detecção dos genes das OXA-carbapenemases nos isolados de *Acinetobacter* spp. por PCR multiplex.**

Oxacilinase	Tamanho (pb)	Sequência do <i>primer</i> Foward	Sequência do <i>primer</i> Reverse
<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	501	5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3'	5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'

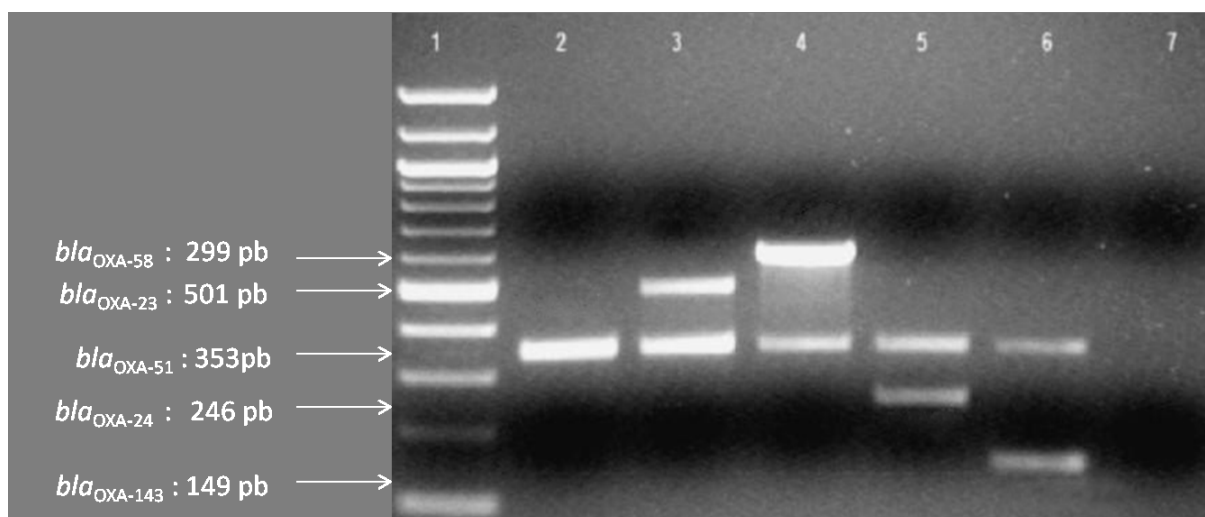
<i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub>	246	5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3'	5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3'
<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	353	5'-TAA TGC TTT GATCGG CCT TG-3'	5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'
<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub>	599	5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3'	5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3'
<i>bla</i> <sub>OXA-143-like</sub>	149	5'-TGG CAC TTT CAG CAG TTC CT-3'	5'-TAA TCT TGA GGG GGC CAAC-3'

A extração do DNA bacteriano para realização do PCR foi feita por lise térmica a partir de subcultivo das amostras em ágar Müller-Hinton a 37°C por 18 a 24 horas.

Para realização da reação de PCR foi preparada uma solução mãe (*mix*) contendo: água ultrapura, solução MgCl<sub>2</sub> 50mM, tampão da taqpolimerase 10X, dinucleotídeos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, enzima taqpolimerase 5U/μL, 10mM de *primer forward* e *reverse* para cada uma das sequências gênicas acima. Após o preparo 15 μL do *mix* foram distribuídos nos tubos de amplificação (*ependorfs* de 200 μL) e 10μL do DNA extraído foi adicionado à reação. As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial à 94°C por 5 min. seguida de 30 ciclos à 94°C por 25 s, 52°C por 40 s, 72°C por 50 s, e uma etapa final de alongamento a 72°C por 6 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1:20. No preparo do gel foi adicionado 5,2 μL de brometo de etídio para corar o DNA. Misturou-se 1μL de tampão de corrida para cada 5μL de produto de PCR. O gel foi carregado com 10 μL da mistura de tampão e amostra e submetido à eletroforese. Após a corrida o gel foi visualizado e fotografado contra luz UV em transluminador.

Controles positivos de cada sequência foram utilizados, obtidos a partir de cepas ATCC que continham alelos *bla*<sub>OXA</sub>, previamente caracterizados por sequenciamento e cujos amplicons correspondiam ao tamanho predito (figura 4).



**Figura 4. Detecção dos genes das Oxa-carbapenemases por PCR multiplex.** Cepas controles contendo os alelos codificantes para: *bla*<sub>OXA-51</sub> (linha 2), *bla*<sub>OXA-23</sub> e *bla*<sub>OXA-51</sub> (linha 3), *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-51</sub> (linha 4), *bla*<sub>OXA-24</sub> e *bla*<sub>OXA-51</sub> (linha 5) e *bla*<sub>OXA-143</sub> e *bla*<sub>OXA-51</sub> (linha 6). A linha 1 contém o marcador de peso molecular (MPM) e a linha 7 um controle negativo (CN) que não continha DNA.

#### 5.4 Tipagem molecular por PFGE

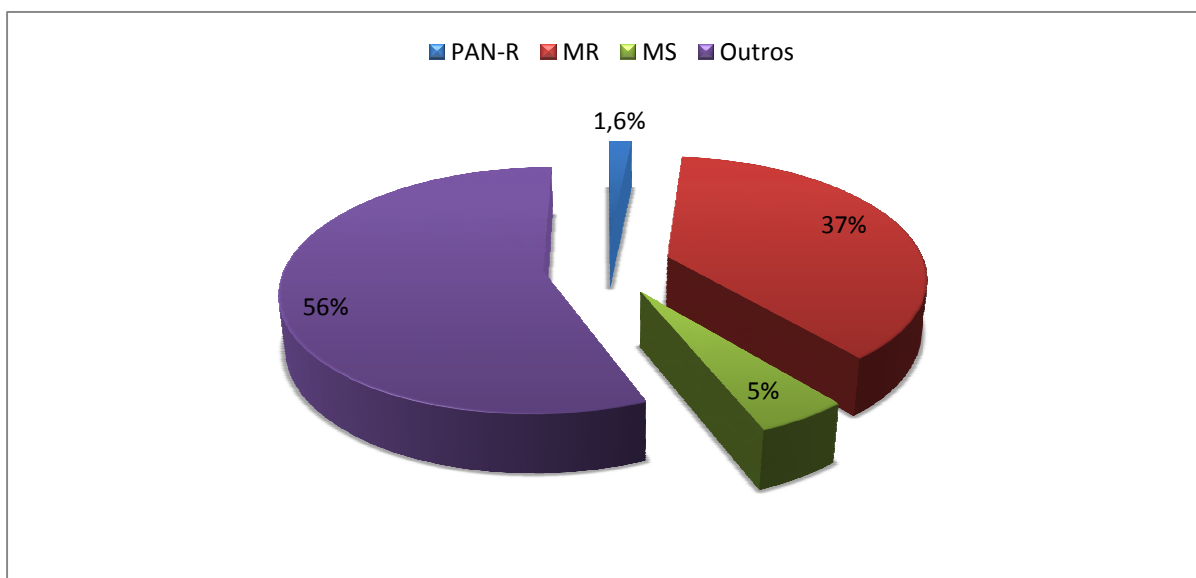
A tipagem molecular dos isolados foi feita por PFGE para determinar a relação genética entre os isolados positivos para os genes *bla*<sub>OXA-51</sub> e *bla*<sub>OXA-23</sub>, sendo todos resistentes aos carbapenêmicos. Os isolados foram submetidos a restrição enzimática com a endonuclease de restrição *Apal* e posteriormente corridos em gel de agarose por 23 horas, usando o equipamento CHEF-DRII. A análise dos padrões de PFGE foram feitas no software BioNumerics versão 6.0 a partir da fotografia do gel corado com brometo de etídio.

## 6 RESULTADOS

Foram analisados 132 isolados de *Acinetobacter* spp. de três hospitais (1, 2 e 3) de Porto Alegre, no período de março a dezembro de 2011. O hospital 2 apresentou o maior número de isolados (65), seguido do hospital 1 (50 isolados) e o hospital 3 (17 isolados). Apenas um isolado por paciente foi incluído neste estudo.

Foram encontrados 124 (94%) isolados de *A. baumannii*, identificados por PCR pela presença do gene *bla*<sub>OXA-51</sub>. Destes 124 isolados, 89 (67,4%) isolados foram positivos para o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> e demonstraram resistência aos carbapenêmicos: imipenem e meropenem, além de outras classes de antimicrobianos (figura 5). Nenhum isolado apresentou positividade para os genes das demais OXA-carbapenemases pesquisadas: *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub>. Além destes, 8 isolados (6%) não foram positivos para nenhuma OXA-carbapenemase pesquisada, sendo possivelmente outra espécie de *Acinetobacter* que não *A. baumannii*.

O hospital que apresentou maior taxa de resistência aos carbapenêmicos foi o hospital 2: 54/65 (83%), seguido do hospital 3: 14/17 (82,3%), e o hospital 1: 22/50 (44%), estes dados podem ser visualizados na tabela 6. Dos 124 isolados *A. baumannii*, 37% foram considerados MRs e 1,6% foram considerados panrresistentes (figura 5). A maioria dos isolados MRs foi obtida no hospital 2 e os isolados panrresistentes foram obtidos dos hospitais 1 e 2.



**Figura 5. Perfis de susceptibilidade dos 124 isolados de *A. baumannii* frente aos antimicrobianos testados. PAN-R (panrresistentes):** refere-se a isolados resistentes a todas as classes de antimicrobianos testados. **MR (multirresistentes):** refere-se a isolados resistentes a todos os antimicrobianos testados, exceto polimixina B e tigeciclina; **MS (Multissensíveis):** refere-se a isolados sensíveis a todos os antimicrobianos testados; **Outros:** refere-se a isolados que não se encaixam em nenhum dos demais perfis, inclui susceptibilidade intermediária aos antimicrobianos.

**Tabela 6. Perfis de susceptibilidade aos carbapenêmicos considerando cada hospital e o tipo de enzima OXA-carbapenemase inferida, nos 124 isolados de *A. baumannii*.**

Oxacilinase/ Susceptibilidade	Hospital (número de isolados)		
	1	2	3
OXA-51/Carba R	0	0	0
OXA-51/Carba S	23	9	3
OXA-51+OXA-23/Carba R	21	54	14
OXA-51+OXA23/Carba S	0	0	0

**Carba R-** isolado com perfil de resistência aos carbapenêmicos. **Carba S-** isolado com perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos.

Altas taxas de resistência foram encontradas em outras classes de antimicrobianos, sendo os antimicrobianos que apresentaram maior taxa de resistência: cefepima, ciprofloxacina e ceftazidima, respectivamente. Outros antimicrobianos testados, amicacina e ampicilina/sulbactama, também demonstraram alta taxa de resistência frente aos isolados. As CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> e a atividade dos antimicrobianos pode ser observadas na tabela 7.

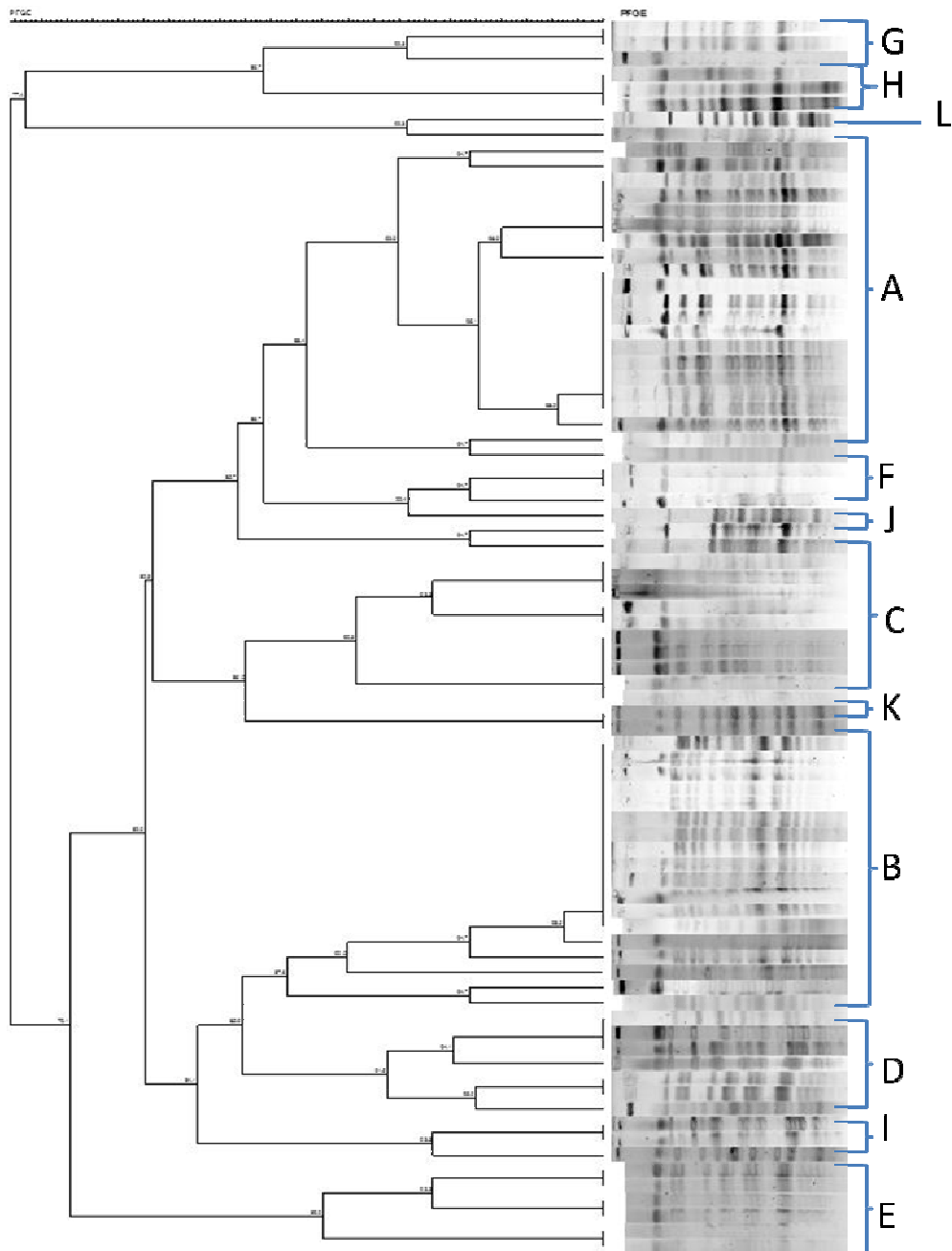
**Tabela 7. CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> e atividade dos antimicrobianos testados nos 132 isolados de *Acinetobacter* spp.**

ANTIMICROBIANO	CIM (µg/mL)		RESULTADO (%)	
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Sensível	Resistente
Amicacina	64	256	37	63
Ampicilina/sulbactama	32	64	37	63
Cefepime	64	512	16,7	83,3
Ceftazidima	128	256	25,8	74,2
Ciprofloxacina	64	64	18,2	81,8
Imipenem	64	128	32,6	67,4
Meropenem	32	64	32,6	67,4
Polimixina B	0,25	0,5	97	3

Nove isolados (6,8%) apresentaram CIM  $\geq$  4 µg/mL para tigeciclina. Para a polimixina B, 4 (3%) isolados apresentaram resistência (CIM  $\geq$  4 µg/mL) e destes isolados todos foram resistentes aos carbapenêmicos.

Oitenta isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos foram submetidos a tipagem molecular pela técnica de PFGE, resultando em 12 clones distintos (> 87% de similaridade). O dendrograma pode ser observado na figura 6.





**Figura 6. Dendrograma dos 80 isolados de *A. baumannii* OXA-23 positivos e resistentes aos carbapenêmicos tipados por PFGE (similaridade >87%).**

O clone com maior quantidade e diversidade, mostrou 21 isolados de *A. baumannii* pertencentes aos três hospitais (clone A). Outros clones mostraram resultados diferentes, contendo isolados pertencentes a dois ou apenas um dos hospitais, com exceção do clone B e D cujos isolados pertencem aos três hospitais.

O clone L foi o que mostrou menor quantidade e diversidade, contendo apenas 1 isolado de *A. baumannii* (tabela 8) Alguns isolados do mesmo hospital mostraram 100% de similaridade, mas isto também foi observado entre isolados de hospitais diferentes.

**Tabela 8. Distribuição dos isolados de *A. baumannii* nos clones formados com similaridade >87% por PFGE.**

Clones	Número de isolados por hospital		
	1	2	3
A	2	17	2
B	5	7	6
C	5	5	0
D	3	3	1
E	0	6	0
F	1	3	0
G	1	0	2
H	0	1	2
I	2	1	0
J	0	2	0
K	2	0	0
L	0	1	0

## 7 DISCUSSÃO

Infecções e surtos nosocomiais tendo *A. baumannii* MR como agente etiológico têm sido cada vez mais relatados no Brasil e no mundo e, a emergência da resistência aos antimicrobianos em isolados clínicos de *A. baumannii* resistente a antimicrobianos de amplo espectro inclusive aos carbapenêmicos, utilizados em infecções graves por este patógeno, limita as alternativas terapêuticas. A resistência aos antimicrobianos em *Acinetobacter* está associada a diferentes mecanismos, sendo a aquisição de enzimas  $\beta$ -lactamases o principal (Hawkey *et al.* 2009; Ferreira, *et al.* 2011) e, sendo a expressão de enzimas do tipo OXA, o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos.

No Brasil, *A. baumannii* multirresistente tem emergido como um patógeno nosocomial desde 1993, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), resultando em um patógeno endêmico (Gales *et al.*, 2001) e associado à elevada morbidade (Martins *et al.*, 2012). Neste estudo, foi encontrada alta prevalência de *A. baumannii* (94%) entre os isolados, sendo a maioria positiva para o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> e multirresistentes (37%), incluindo resistência aos carbapenêmicos, sendo a maioria destes isolados pertencentes ao hospital 2, o qual comporta maior número de UTIs dentre os hospitais estudados. Esses resultados são similares a maioria dos estudos, onde *A. baumannii* é a espécie de maior prevalência em infecções/surtos nosocomiais, sendo também multirresistente, e sendo a resistência aos carbapenêmicos normalmente associada a produção da carbapenemase OXA-23 (Martins *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010, Ferreira *et al.*, 2011). O gene *bla*<sub>OXA-23</sub> é muito prevalente no mundo e também na cidade de Porto Alegre.

Apesar das altas taxas de resistência encontradas, não podemos afirmar que a presença dos genes *bla*<sub>OXA-51</sub> e *bla*<sub>OXA-23</sub>, seja de fato o mecanismo responsável por esta alta taxa de resistência aos carbapenêmicos (67,4%), pois outros fatores estão envolvidos, já que os genes *bla*<sub>OXA</sub> necessitam de elementos de inserção, localizados *upstream*, com promotores fortes para regular sua expressão (Heritier *et al.*, 2005; Turton *et al.*, 2006, Zarilli, *et al.*, 2009). Além disso, outros mecanismos como efluxo e alterações na permeabilidade de membrana os quais não foram

avaliados neste estudo, estão envolvidos (Zavascki *et al.*, 2010), podendo ter afetado os outros antimicrobianos testados, já que altas taxas de resistência foram encontradas. No entanto, neste estudo nenhum isolado positivo para os genes *bla*<sub>OXA-51</sub> e *bla*<sub>OXA-23</sub> foi sensível aos carbapenêmicos, o que sugere fortemente que o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos seja a produção de OXA-23.

A maioria (94%) dos isolados foram positivos para o gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, confirmando a identificação da espécie *A. baumannii*, resultados similares foram encontrados por Ferreira *et al.* 2011, que observou 84% dos isolados positivos para *bla*<sub>OXA-51</sub> em um estudo realizado em cinco hospitais de Porto Alegre. Em outro estudo realizado com *Acinetobacter* spp. na cidade de Porto Alegre por Martins *et al.* em 2009, todos os 53 isolados analisados foram positivos para os genes *bla*<sub>OXA-51</sub> e *bla*<sub>OXA-23</sub>. Estes dois estudos também mostraram alta prevalência de resistência aos carbapenêmicos.

Os isolados *bla*<sub>OXA-51</sub> positivos e negativos para o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foram todos sensíveis aos carbapenêmicos. O gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, intrínseco da espécie *A. baumannii* é capaz de conferir resistência aos carbapenêmicos quando regulado pelo elemento IS*Aba1* (Turton *et al.*, 2006; Zarilli *et al.*, 2009).

Em alguns isolados (6%) o mecanismo de resistência não pôde ser inferido, pois não houve amplificação no PCR com os *primers* utilizados no estudo. No entanto, não podemos afirmar que a susceptibilidade aos carbapenêmicos neste isolados deve-se ao fato de não possuírem enzimas do tipo OXA-carbapenemases, pois, a resistência a estes antimicrobianos pode também estar associada a outros mecanismos como citado acima. Além disso, este resultado concorda com os estudos que mostram a elevada prevalência de *A. baumannii* entre isolados clínicos de *Acinetobacter* spp.

No Brasil, até o momento, a OXA-143 foi encontrada na cidade de São Paulo (Higgins *et al.*, 2008; Antonio *et al.*, 2011; Mostachio *et al.*, 2012) e Rio de Janeiro (Wernerck *et al.*, 2011). Na América do Sul o gene *bla*<sub>OXA-58</sub> só havia sido reportado na Argentina, comumente associado à resistência aos carbapenêmicos em surtos por *Acinetobacter* spp., em 2012 foi reportado em um isolado, o qual apresentou

resistência ao imipenem, e a inserção do elemento ISAb<sub>1</sub> *upstream* a *bla*<sub>OXA-58</sub> (Coelho *et al.*, 2006; Gusatti *et al.*, 2012).

O subgrupo OXA24/40 parece ser menos disseminado do que as enzimas OXA-23-like (Zavascki *et al.*, 2010). Já foram reportadas enzimas pertencentes a este grupo, na Europa; nos Estados Unidos, Ásia (Barnaud *et al.*, 2010; Poirel *et al.*, 2010; Zavascki *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011). No Brasil, apenas a OXA-72 foi descrita em *A. baumannii* recentemente (Werneck *et al.*, 2011).

Dos 12 clones AbRC encontrados nos três hospitais analisados, dois grupos clonais majoritários contém isolados pertencentes a todos os hospitais. A disseminação de AbRC inter-hospital pode estar associada a transferência de pacientes infectados/colonizados de um hospital para o outro. Isto foi relatado previamente em diferentes países como França, Inglaterra, Holanda, Estados Unidos e Colômbia e também no Brasil (Coelho *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011).

## 7 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível caracterizar isolados de *A. baumannii* provenientes de diferentes hospitais da cidade de Porto Alegre, analisando o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, os mecanismos de resistência pela busca de enzimas oxacilinases prevalentes no gênero, e pela tipagem molecular por PFGE.

A presença de 2 clones majoritários em todos os hospitais (grupos clonais A e B) demonstra a disseminação inter-institucional de AbRC, portador de OXA-23, podendo esta ser a causa de alta prevalência de resistência aos carbapenêmicos observada (67,4%) nos isolados. Além disso, resistência elevada foi encontrada para outros antimicrobianos, a qual pode estar associada a outros fatores como alta permeabilidade de membrana, hiperexpressão de bombas de efluxo, e mutações em sítios de ligação dos antimicrobianos.

Apesar das altas taxas de resistência aos carbapenêmicos e aos demais antimicrobianos testados, polimixina B e tigeciclina permanecem com bom perfil de sensibilidade, sendo ainda uma boa alternativa terapêutica em casos de infecção por *A. baumannii* MR, incluindo resistência aos carbapenêmicos.

## 8 REFERÊNCIAS

- Ambler, RP. The Structure of  $\beta$ -Lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. of Lond. B* 289: 321-331, 1980.
- Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM. High Prevalence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Carrying the blaOXA-143 Gene in Brazilian Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(3): 1322–1323, 2011.
- Barnaud G, Zihoune N, Ricard JD, Hippeaux MC, Eveillard M, Dreyfuss D, Branger C. Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France. *J. Hosp. Infect.* 76(4): 358-60, 2010.
- Bergogne-Bérézin E, Towner, K. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Amer. Soc. Microbiol.* 9(2): 148-165, 1996.
- Bertoncheli CM, Hörner R. Uma revisão sobre metalo- $\beta$ -lactamases. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44: 577-99, 2008.
- Bhattacharya M, Parakh A, Narang M. Tigecycline. *J. Postgrad. Med.* 55(1):65-8, 2009.
- Bonnet R, Marchandin H, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Jumas-Bilak E, Siro J. Chromosome-Encoded Class D  $\beta$ -Lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(6): 2004–2006, 2002.
- Brauers J, Frank U, Kresken M, Rodloff AC, Seifert H. Activities of various beta-lactams and beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* DNA group 3 strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 11:24–30, 2005.
- Bush, K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(6): 1211-1233, 1995.
- Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1369–73, 2010.
- Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34:25–8, 2009.
- Casal M *et al.* Influence of testing methodology on the tigecycline activity profile against presumably tigecycline-non-susceptible *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 64: 69-72, 2009.

Chen TL, Wu RC, Shaio MF, Fung CP, Cho WL. Acquisition of a plasmid-borne *bla*<sub>OXA-58</sub> gene with an upstream *IS1008* insertion conferring a high level of carbapenem resistance to *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2573-2580, 2008.

Choi CH *et al.* Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cel. Microbiol.* 7 (8):1127-1138, 2005.

Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S20. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M07-A8 informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, Palepou MF, Pike R, Pitt TL, Patel BC, Livermore DM. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J. Clin. Microbiol.* 44 (10):3623-3627, 2006.

Coelho JM, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore DM. Occurrence of OXA-58-Like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(2): 756–758, 2006.

Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*OXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(4):1530-1533, 2007.

Cunha BA. Pharmacokinetic considerations regarding tigecycline for multi-drug resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* or MDR *Acinetobacter baumannii* urosepsis *J. Clin. Microbiol.* 47(5):1613, 2009.

Curcio D. Treatment of recurrent urosepsis with tigecycline: a pharmacological perspective. *J. Clin. Microbiol.* 46(5):1892-1893, 2008.

Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HAPHM, Castro MES, Stier CJN, Bragagnolo KL, *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3403-3406, 2003.

Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 939-951, 2007.

Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, Aktas E, Gursoy NC, Caliskan A. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 372-377, 2009.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical breakpoints: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)

Euzeby JP. Lista de nomes de procariotos com nomenclatura permanente: <http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>.



Falagas ME, Bliziotis IA, Tam VH. Intraventricular or intrathecal use of polymyxins in patients with Gram-negative meningitis: a systematic review of the available evidence. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 29: 9-25, 2007.

Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I, Kelesidis T. Community-acquired *Acinetobacter* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26(12):857-868, 2007.

Ferreira, AE, Marchetti, DP, Cunha, GR, Oliveira, LM, Fuentefria, DB, Dall Bello, AG, Barth, AL, Corção, G. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. from hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44:725-730, 2011.

Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin. Infect. Dis.* 42:692-699, 2006.

Franolić-Kukina I, Bedenić B, Budimir A, Herljević Z, Vraneš J, Higgins PG. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72-positive *Acinetobacter baumannii* in a Croatian university hospital. *Int. J. Infect. Dis.* 15(10):706-709, 2011.

Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin. Infect. Dis.* 32 Suppl 2: S104-13, 2001.

Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J. Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: a matched cohort study. *Crit. Care Med.* 31(10):2478-2482, 2003.

Garnacho-Montero J *et al.* Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin. Infect. Dis.* 36: 1111-8, 2003.

Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of Phenotypic Tests for Identification of *Acinetobacter* Species. *J. Clin. Microbiol.* 29(2): 211-282, 1991.

Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *Int. J. Antimicrob. Agents* 32(2):106-119, 2008.

Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 35: 219-26, 2010.

Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin. Investig. Drugs* 17(2):131-143, 2008.

Gusatti CS, Bertholdo LM, Otton LM, Marchetti DP, Ferreira AF, Corção G. First occurrence of blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolated from a clinical sample in southern Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 43(1): 243-246, 2012.

Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 64(1): 3-10, 2009.

Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 4174-4179, 2005.

Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 12(2):123-130, 2006.

Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-field Gel Electrophoresis. *Nature Protocols.* 2(3): 677-684, 2007.

Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. *In vitro* activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1586–92, 2004.

Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:5035–8, 2009.

Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:233-238, 2010.

Holloway KP, Roupael NG, Wells JB, King MD, Blumberg HM. Polymyxin B and doxycycline use in patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in the intensive care unit. *Ann. Pharmacother.* 40:1939–45, 2006.

Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11: 868-873, 2005.

Jin W *et al.* Comparative study of the Inhibition of Metallo- $\beta$ -Lactamases (IMP-1 and VIM-2) by Thiol Compounds That Contain a Hydrophobic Group. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(6): 851-856, 2004.

Kallel H, Bahloul M, Hergafi L *et al.* Colistin as a salvage therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant bacteria in the ICU. *Int. J. Antimicrob. Agents* 28:366–9, 2006.

Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lanc. Infect. Dis.* 8: 751-62, 2008.

Kim YA, Choi JY, Kim CK *et al.* Risk factors and outcomes of blood-stream infections with metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter*. *Scand. J. Infect. Dis.* 40(3): 234-240, 2008.

Koh TH, Sng LH, Wang GCY, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 627 – 632, 2007.

Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymixins revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(3): 449-465, 2008.

Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT: Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(1): 49-54, 2008.

Lee, YT., *et al.* First identification of blaOXA-51-like in non-baumannii *Acinetobacter* spp. *J. Chemother.* 21(5): 514-20, 2009.

Lee, YT. *et al.* Emergence of Carbapenem-Resistant Non-*baumannii* Species of *Acinetobacter* Harboring a blaOXA-51-Like Gene That Is Intrinsic to *A. baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(2): 1124–1127, 2012.

Levin AS. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 21: 58-62, 2003.

Li J, Ragner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, *et al.* Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2946–50, 2006.

Lima AL, Oliveira PR, Paula AP. *Acinetobacter* infection. *N. Engl. J. Med.* 358(26):2846; author reply 2846-2847, 2008.

Lin WR, Lu PL, Siu LK, Chen TC, Lin CY, Hung CT, Chen YH. Rapid control of a hospital-wide outbreak caused by extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii*. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 27(6): 207-214, 2011.

Livermore DM, Dudley MN. Antimicrobials: better use, better drugs, or both? *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 487-488, 2000.

Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where it should be used? *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 611:614, 2005.

Livermore DM, Woodford N. The  $\beta$ -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 14(9): 413-420, 2006.

Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, Quinn JP. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(9):2941-2945, 2006.

Lu PL, Doumith M, Livermore DM, Chen TP, Woodford N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J. Antimicrob. Chemother.* 63: 641–7, 2009.

Mak JK, Kim MJ, Pham J, Tapsall J, White PA. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63(1):47-54, 2009.

Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Antimicrob. Res.* 46: 1254-1263, 2008.

Marchaim D. *et al.* Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 45(5): 1551-1555, 2007.

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*. 37:474-476, 2009.

Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Amer. J. Inf. Cont.* 40: 108-112, 2012.

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*. 39(5): 396-401, 2012.

Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*<sub>OXA-23</sub> carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* 16:35–40, 2010.

Munoz LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N. Engl. J. Med.* 358:1271-1281, 2008.

Murray CK, Hospenthal DR. *Acinetobacter* infection in the ICU. *Crit. Care Clin.* 24:237-48, 2009.

Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJK, Deschagh P, Passet V, Vaneechoutte M, Brisse S, Dijkshoorn L. 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.* 162: 393–404, 2011.

Owen RJ, Li J, Nation RL, Spelman D. *In vitro* pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 59(3):473-477, 2007.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(3): 538-582, 2008.

Peterson LR. A review of tigecycline-the first glycylcycline. *Int. J. Antimicrob. Agents* 32: 215-22, 2008.

Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:371-379, 2010.

Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE *et al.* Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulphonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with Gram-negative bacterial infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(8): 3430-3436, 2009.

Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 202-208, 2005.

Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 826 – 36, 2006.

Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* 2: 501–12, 2007.

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.* 52(4): 1252-1256, 2008.

Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 24–38, 2010.

Pontes VMO *et al.* Perfil de Resistência de *Acinetobacter baumannii* a Antimicrobianos nas Unidades de Terapia Intensiva e Semi-Intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 38(2): 123-126, 2006.

Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 557-561, 2006.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20(3): 440-458, 2007.

Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem hydrolysing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(2): 223-232, 1997.

Rasmussen JW, Hoiby N. Oxa-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 373-383, 2006.

Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(3): 1354-1357, 2009.

Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo  $\beta$ -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25:57–61, 2005.

Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37(1): 67–75, 1984.

Seifert *et al.* Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43(9): 4328-4335, 2005.

Siegel JD *et al.* Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings. *Amer. J. Infect. Contr.* 35: 165-93, 2007.

Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ: Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(3):512-530, 2006.

Stoeva T, Higgins PG, Bojkova K, Seifert H. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:723–7, 2008.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, and Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233–2239, 1995.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV *et al.* How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 18(6): 426 – 439, 1997.

Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS.* 97(7): 595-605, 1989.

Turton JF *et al.* Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44(8): 2974-6, 2006.

Turton JF, Hyde R, Martin K, Shah J. Genes Encoding OXA-134-like enzymes are found in *Acinetobacter lwoffii* and *A. schindleri* and can be used for identification. *J. Clin. Microbiol.* 50(3): 1019–1022, 2012.

Urban C, Segal-Maurer S, Rahal J. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis.* 36(10):1268-74, 2003.

U.S. Food and Drug Administration:

[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2009/021821s016lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/021821s016lbl.pdf)

Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, van der Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell J. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 45 (2):453-460, 2007.

Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, Livermore D, Quinn JP. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in colombian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(6):2001-2004, 2007.

Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 36(3): 8-14, 2010.

Werneck JS, Picão RC, Girardello R, Cayô R, Marguti V, Dalla-Costa LM, Gales AC. Low Prevalence of *bla*<sub>OXA-143</sub> in Private Hospitals in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(9): 4494–4495, 2011.

Westbrook G, Holmes H. Epidemiologic strain typing. In: H. D. Isenberg (Ed.). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Second Edition. Washington, DC: ASM Press, v.1, p.13.5.1 – 13.5.5, 2004

Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* sp. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27:351-353, 2006.

Yang SC, Chang WJ, Chang YH, Tsai YS, Yang TP, Juan CW, Shiau MY. Prevalence of antibiotics resistance and OXA carbapenemases genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in central Taiwan. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29(5): 601-604, 2010.

Yau, W *et al.* Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J. Infect.* 58: 138-144, 2009.

Zarrilli R *et al.* Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J. Infect. Develop. Count.* 3(5): 335-341, 2009.

Zavascki AP, Soares FC, Superti S, Silbert S, Silva FM, Barth AL . Stable carbapenem susceptibility rates among multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. strains in a setting of high prevalence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30:187-189, 2007.

Zavascki AP *et al.* Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients. *Clin. Infect. Dis.* 47: 1298-1304, 2008.

Zavascki AP *et al.* Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Review Anti Infect. Ther.* 8: 71-93, 2010.

Zhou H, Yang Q, Yu YS, Wei ZQ, Li LJ. Clonal spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* among different cities of China. *J. Clin. Microbiol.* 45:4054–7, 2007.