

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

**IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE E ANÁLISE FENOTÍPICA DA EXPRESSÃO
DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA EM ISOLADOS CLÍNICOS E DE
EFLUENTE HOSPITALAR DE *Acinetobacter* sp.**

Karine Lena Meneghetti

Biomédica – ULBRA

Março, 2014.

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

**IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE E ANÁLISE FENOTÍPICA DA EXPRESSÃO
DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA EM ISOLADOS CLÍNICOS E DE
EFLUENTE HOSPITALAR DE *Acinetobacter* sp.**

Karine Lena Meneghetti

Biomédica – ULBRA

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Dra. Gertrudes Corção

Porto Alegre, RS, Brasil

Março, 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Lena Meneghetti, Karine

Identificação da espécie e análise fenotípica da expressão de proteínas de membrana externa em isolados clínicos e de efluente hospitalar de *Acinetobacter* sp. / Karine Lena Meneghetti. -- 2014. 114 f.

Orientadora: Gertrudes Corção.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. *Acinetobacter* sp. 2. proteínas de membrana externa. 3. resistência antimicrobiana. I. Corção, Gertrudes, orient. II. Título.

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

AGRADECIMENTOS

A Dra. Gertrudes Corção, pela oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação, pela dedicação, ensinamentos, paciência e disponibilidade.

A todos professores do PPGMAA que sempre muito atenciosos colaboraram para minha formação.

As colegas pós-graduandas do laboratório 166 Natália Canal, pelo carinho, ajuda e conhecimentos transmitidos. A Ana Paula Winter Pastore, pelo apoio, incentivo e companheirismo diários. A Letícia Otton, pela amizade e disposição em sempre ajudar a esclarecer minhas dúvidas. Obrigada pela companhia e por terem feito os dias no laboratório tão agradáveis e alegres.

Aos estagiários Marina Bastos, por sempre ajudar quando necessário e Juliano Dellazen, por auxiliar na realização dos experimentos.

Aos colegas e amigos Belize Leite, Thaisa Feltrin e Mauricio Ramírez, por sempre estarem dispostos a ajudar no que fosse necessário e aos colegas dos laboratórios 164, 165 e 167 pela convivência e parceria.

A minha colega e amiga de faculdade Francine Melise dos Santos, por sempre estar ao meu lado. Pessoa essencial em minha vida.

Ao meu amor Luiz Felipe Montanari, pelo carinho, compreensão e por acreditar sempre em mim. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus pais Fátima Lena Meneghetti e João Carlos Meneghetti, por todo incentivo, amor e confiança; as melhores pessoas que eu conheço, verdadeiros exemplos para mim.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Identificação da espécie e análise fenotípica da expressão de proteínas de membrana externa em isolados clínicos e de efluente hospitalar de *Acinetobacter* sp.¹

Resumo

Autora: Karine Lena Meneghetti

Orientadora: Dra. Gertrudes Corção

Acinetobacter sp. apresenta altos níveis de resistência intrínseca a muitos antimicrobianos que pode estar relacionada à perda ou à diminuição da expressão de proteínas de membrana externa (OMPs). O presente trabalho teve como objetivos: identificar as espécies e analisar o perfil fenotípico de OMPs de 19 isolados multirresistentes de *Acinetobacter* sp. (16 de origem clínica e 3 de efluente hospitalar) e seus revertentes cultivados na presença e ausência de imipenem (IMP) e ceftazidima (CAZ), para verificar possível alteração no perfil das OMPs diante destas condições; detectar fenotipicamente sistema de efluxo e avaliar os dados de outros mecanismos de resistência encontrados em trabalhos anteriores com os isolados em estudo. Os isolados foram identificados através da amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*, para verificar qual é mais discriminatório. Para a detecção de bomba de efluxo foi comparada a concentração inibitória mínima (CIM) de IMP e CAZ na presença e ausência de carbonil-cianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP). A extração de OMPs foi realizada conforme Laemmli (1970), com padronização e posterior análise por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gene *rpoB* demonstrou ser mais discriminatório que o gene 16S rRNA, identificando os isolados com 99 a 100% de similaridade com *Acinetobacter baumannii*. Foi observada alteração no perfil de OMPs em quatro isolados sendo que em três destes, a perda da expressão de proteínas de 34-35-kDa e 53-kDa pôde ser associada à resistência ao IMP. Maioria dos isolados apresentaram mais de um mecanismo de resistência antimicrobiana.

1 Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (114p), Março, 2014.

Species identification and phenotypic analysis of the expression of outer membrane proteins in clinical and hospital wastewater isolates of *Acinetobacter* sp.¹

Abstract

Author: Karine Lena Meneghetti

Advisor: Dr. Gertrudes Corção

Acinetobacter sp. shows high levels of intrinsic resistance to many antimicrobials which can be associated with the loss or reduced expression of outer membrane proteins (OMPs). This study aimed to: identify the species and analyze the OMPs profile of 19 multiresistant strains of *Acinetobacter* sp. (16 of clinical origin and 3 of hospital wastewater) and its revertants grown in the presence and absence of imipenem (IMP) and ceftazidime (CAZ) to verify possible changes in the profile of OMPs on these conditions; phenotypically detect efflux system and evaluate data from other resistance mechanisms found in previous studies with the isolates under study. The isolates were identified through amplification by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of 16S rRNA and *rpoB* genes to verify which is more discriminatory. For detection of efflux pump was compared the minimal inhibitory concentration (MIC) of IMP and CAZ in the presence and absence of carbonyl-cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP). The extraction of OMPs was performed according to Laemmli (1970), with standardization and subsequent analysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The *rpoB* gene proved to be more discriminating than the 16S rRNA gene, identifying the isolates with 99 to 100% similarity to *Acinetobacter baumannii*. It was observed changes in OMPs profile in four strains and in three of these, the loss of expression of proteins of 34-35 kDa and 53 kDa, could be associated with resistance to IMP. Most isolates showed more than one mechanism of antimicrobial resistance.

1 Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (114p), March, 2014.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	ix
RELAÇÃO DE FIGURAS	x
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>Acinetobacter</i> sp.	4
2.2 Métodos de identificação de espécies de <i>Acinetobacter</i>	11
2.3 Resistência antimicrobiana em <i>Acinetobacter</i> sp.	19
2.4 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos em <i>Acinetobacter</i> sp.	21
2.4.1 β -lactamases	22
2.4.2 β -lactamases de Classe C – AmpC cefalosporinases	23
2.4.3 β -lactamases de Espectro Estendido – ES β L	24
2.4.4 Carbapenemases de Classe A	24
2.4.5 Carbapenemases de Classe B – Metallo- β -lactamases	25
2.4.6 Carbapenemases de Classe D – Oxacilinases	27
2.4.7 Hiperexpressão de Sistemas de Efluxo	31
2.4.8 Alteração das Proteínas Ligadoras de Penicilinas (PBPs)	33
2.4.9 Perda ou diminuição da expressão das proteínas de membrana externa (OMPs)	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Meios de cultura e soluções	44
3.2 Isolados bacterianos	44
3.3 Recuperação dos isolados	45
3.4 Identificação das espécies de <i>Acinetobacter</i>	46
3.4.1 Extração do DNA	46
3.4.2 Amplificação dos genes 16S rRNA e <i>rpoB</i> dos isolados	47
3.5 Concentração inibitória mínima	49
3.6 Análise fenotípica de sistema de efluxo dependente de força próton motiva	50
3.7 Análise fenotípica do perfil de OMPs	51
3.7.1 Obtenção dos revertentes dos isolados	51
3.7.2 Extração de proteínas de membrana externa	53

3.7.3 Análise das proteínas de membrana externa (OMPs)	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Identificação das espécies de <i>Acinetobacter</i> sp.	56
4.2 Análise dos mecanismos de resistência ao IMP e CAZ nos isolados	65
5. CONCLUSÕES	84
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8. ANEXOS	110
8.1 Meios de cultura.....	110
8.2 Soluções para eletroforese em gel de agarose.....	110
8.3 Soluções para SDS-PAGE.....	111

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1: Nomenclatura atual e prévia e referência bibliográfica das 33 espécies de <i>Acinetobacter</i> descritas.....	9
TABELA 2: Isolados de <i>Acinetobacter</i> sp. selecionados para este estudo e o perfil de resistência a antimicrobianos.....	46
TABELA 3: Pontos de corte para os antimicrobianos IMP e CAZ segundo CLSI (2012).....	50
TABELA 4: Resultado da análise das sequências dos genes 16S rRNA e <i>rpoB</i>	57
TABELA 5: CIM ao IMP e CAZ dos isolados e seus revertentes.....	66
TABELA 6: CIM dos isolados ao IMP e CAZ na presença e ausência de CCCP, detecção dos genes <i>adeA</i> , <i>adeB</i> , <i>adeC</i> , <i>adeR</i> , <i>adeS</i> , <i>bla</i> _{-OXA-23} , <i>bla</i> _{-OXA-51} e a sequência de inserção IS <i>Aba1</i> e perfil fenotípico das OMPs.....	69
TABELA 7: Perfis de OMPs encontrados em rev1 e rev2 ao IMP nos isolados.....	77

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação gráfica de sítios variáveis no gene <i>rpoB</i>	18
FIGURA 2: Estrutura de um monômero de OmpF.....	36
FIGURA 3: Esquema de obtenção dos revertentes dos isolados.....	52
FIGURA 4: Dendrograma representando relações filogenéticas de espécies de <i>Acinetobacter</i> usando o método neighbor-joining. A árvore foi derivada do alinhamento de sequências de um fragmento do gene 16S rRNA.....	61
FIGURA 5: Dendrograma representando relações filogenéticas de espécies de <i>Acinetobacter</i> usando o método neighbor-joining. A árvore foi derivada do alinhamento de sequências da zona 1 do gene <i>rpoB</i>	62
FIGURA 6: Perfil de OMPs mais frequentemente encontrado nos isolados, sem alteração durante a obtenção dos revertentes. Análise por SDS-PAGE (15% de poliacrilamida).....	67
FIGURA 7: Perfil de OMPs de IC 186. Análise por SDS-PAGE (15% de poliacrilamida).....	71
FIGURA 8: Perfil de OMPs de IC 289. Análise por SDS-PAGE (15% de poliacrilamida).....	73
FIGURA 9: Perfil de OMPs de IC 283. Análise por SDS-PAGE (15% de poliacrilamida).....	74

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% – Porcentual
≤ – Menor ou igual
≥ – Maior ou igual
°C – Grau Celsius
β – Beta
μg – Micrograma
μL – Microlitro
μM – Micromolar
AFLP – Análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos
AIM – *Australian imipenemase*
AMI – Amicacina
AMP – Ampicilina
APS – Solução de persulfato de amônio
ARDRA – análise de restrição do DNA ribossomal amplificado
ATCC – *American Type Culture Collection*
ATM – Aztreonam
BHI – Caldo infusão cérebro coração
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
CAZ – Ceftazidima
CCCP – Carbonil-cianeto-m-clorofenilhidrazona
CHDL – *Carbapenem-Hydrolyzing Class D β-Lactamase*
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CIP – Ciprofloxacina
CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*
CPM – Cefepime
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA – Ácido etileno-diamino-tetracético
ESβL – β-lactamase de espectro estendido
et al – e colaboradores
g – gramas
g – Unidades de gravidade
GEN – Gentamicina
GES – *Guiana Extended Spectrum*
GIM – *Germany Imipenemase*
HCl – Ácido clorídrico

I – Intermediário
 IMP – Imipenem
 IS – Sequência de inserção
 IS_{Aba} – Sequência de inserção *Acinetobacter baumannii*
 Kb – Kilobase
 kDa - Kilodalton
 KHM – *Kyorin Hospital metallo-β-Lactamase*
 L – Litro
 LB – Ágar Luria-Bertani
 M – Molar
 MALDI-TOF MS – Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo
 MATE – *Multidrug and Toxic Compound Extrusion*
 MDR – *Multi-Drug Resistance*
 MER – Meropenem
 MFS – *Major Facilitator Superfamily*
 mg – Miligrama
 MgCl₂ – Cloreto de magnésio
 mL – Mililitro
 MLST – Tipificação por sequenciamento de multilocus
 mM – Milimolar
 MβL – Metallo-β-Lactamase
 NaCl – Cloreto de sódio
 NDM – *New Delhi metallo-β-lactamase*
 ng - Nanograma
 NJ – *Neighbor-Joining*
 OMP – Proteína de membrana externa
 OXA – Oxacilinase
 pb – Pares de bases
 PBPs – Proteínas ligadoras de penicilinas
 PBS – Solução tampão fosfato de sódio
 PCR – Reação em cadeia da polimerase
 pH – Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons de hidrogênio em solução
 PMSF – Fluoreto fenil- metil-sulfonila
 PPT – Piperacilina-tazobactam
 R – Resistente
 rev – revertente
 RND – *Resistance-Nodulation-Division*
 rRNA – RNA ribossomal
 S – Sensível
 SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poli(acrilamida dodecil sulfato de sódio)
 SIM – *Seul Imipenemase*
 SMR – *Small Multidrug Resistance*
 SPM – São Paulo Metallo- β-Lactamase
 SUT – Sulfametoxazol-trimetoprim
 TAE – Tampão Tris-acetato-EDTA
 TBE – Tampão Tris-borato-EDTA

TEMED – *N,N,N',N'* - Tetrametiletilenodiamino
TIC – Ticarcilina-ácido clavulânico
TSA – Ágar Triptona de Soja
Tris – Tris (hidroximetil) aminometano
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UTI – Unidade de Terapia Intensiva
UV – Luz ultra violeta
V – Volt

1. INTRODUÇÃO

Espécies bacterianas de *Acinetobacter* podem ser encontradas no solo, água, alimentos, até mesmo na pele humana, mas também têm sido comumente isoladas no ambiente hospitalar. Estes microrganismos estão relacionados a um amplo espectro de infecções como pneumonias, infecções urinárias, meningites e bacteremias, emergindo como importantes patógenos oportunistas.

Entretanto o conhecimento da epidemiologia e ecologia de muitas espécies de *Acinetobacter* é limitado, principalmente pela falta de métodos precisos de identificação em nível de espécie. *Acinetobacter baumannii* é considerada a espécie de maior relevância clínica e embora já tenham relatos de outras espécies envolvidas em infecções nosocomiais, pouco se sabe sobre elas. Isto porque os testes fenotípicos rotineiramente utilizados no diagnóstico laboratorial não conseguem distinguir espécies de *Acinetobacter* com fenótipos similares, e assim por ser mais frequentemente isolado, *A. baumannii* é então reportado erroneamente, enquanto as demais espécies são ofuscadas.

Apesar de espécies não *A. baumannii* serem geralmente sensíveis a uma variedade de antimicrobianos, elas devem ser diferenciadas de *A. baumannii* para que se possa determinar a incidência e o papel delas como patógenos humanos. Como a identificação fenotípica mostra-se

insuficiente, muitos métodos moleculares têm sido estudados e validados a fim de se obter um método confiável de identificação de espécies de *Acinetobacter*. Dentre eles, o sequenciamento do gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA polimerase destaca-se como uma ferramenta adequada para este propósito.

A correta identificação de espécies de *Acinetobacter* também é importante porque o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos varia entre elas. Infecções causadas por *Acinetobacter*, em especial *A. baumannii*, são difíceis de serem tratadas devido sua resistência intrínseca e capacidade de aquisição de novos mecanismos de resistência antimicrobiana. Além de serem microrganismos de fácil adaptação a diferentes ambientes, temperaturas e pH, o que favorece sua permanência e disseminação no ambiente hospitalar.

Esta dispersão se estende até o efluente hospitalar onde cepas que estiveram expostas a antimicrobianos, ou seja, a condições seletivas, acabam sendo descartadas, servindo como reservatórios de genes de resistência e onde também podem interagir com outros microrganismos.

Entre os mecanismos de resistência a antimicrobianos encontrados em *Acinetobacter* sp estão a produção de β -lactamases, perda ou diminuição da expressão das proteínas de membrana externa (OMPs), a alteração da afinidade ou expressão das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) e a hiperexpressão de sistemas de efluxo.

A resistência, em específico aos carbapenêmicos, causa preocupação, pois estes antimicrobianos são uma das últimas opções para o tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* sp. Além disso, o aumento

da frequência de infecções hospitalares associadas a espécies de *Acinetobacter* multirresistentes são fatores que impulsionam o estudo sobre os mecanismos de resistência aos antimicrobianos nestas bactérias.

A perda ou diminuição da expressão das OMPs é um mecanismo de resistência a antimicrobianos ainda pouco elucidado em *Acinetobacter* sp. Trabalhos demonstram que diferentes OMPs podem estar relacionadas à resistência aos β -lactâmicos, enquanto outros trabalhos evidenciam o contrário.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo analisar fenotipicamente a perda da expressão de OMPs em *Acinetobacter* sp. isolados de amostras clínicas e de efluente hospitalar.

Os objetivos específicos foram:

1- Identificar as espécies dos isolados de *Acinetobacter* sp. através da amplificação e sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB* e verificar qual gene é mais discriminatório;

2- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos imipenem (IMP) e ceftazidima (CAZ) e detectar fenotipicamente sistema de efluxo dependente de força próton motiva;

3- Analisar o perfil fenotípico das OMPs nos isolados e seus revertentes cultivados na presença e ausência de IMP e CAZ;

4- Avaliar os dados de mecanismos de resistência de produção de β -lactamases e metalo- β -lactamases, sistema de efluxo AdeABC e presença da sequência de inserção (ISAba1) à frente de OXA-51, detectados em trabalhos anteriores nos isolados em estudo, e os dados obtidos neste trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Acinetobacter* sp.

O gênero *Acinetobacter* compreende cocobacilos Gram-negativos, aeróbios estritos, não móveis, não fermentadores de glicose, catalase-positivos e oxidase-negativos. Não produzem esporos e não apresentam pigmentos. Possuem um conteúdo de G+C de 39 a 47% em seu DNA (Baumann, 1968; Peleg et al., 2008; Howard et al., 2012).

No teste de coloração de Gram, estas bactérias podem apresentar dificuldade na etapa de descoloração, o que pode resultar na identificação errônea como Gram positivas ou cocos Gram lábeis (Vaneechoutte et al., 2011; Howard et al., 2012).

São microrganismos com habilidade de sobreviver em condições hostis sob diferentes temperaturas e pH (Juni, 1978). Podem crescer em meio mineral com acetato como única fonte de carbono e com amônia ou nitrato como fonte de nitrogênio. São capazes de utilizar diferentes compostos orgânicos como fonte de carbono, incluindo compostos aromáticos, açúcares pentose, álcoois e aminoácidos. Não utilizam metanol, glicerol, dissacarídeos e polissacarídeos. Muitas cepas podem produzir lipases e poucas hidrolisam gelatina (Baumann, 1968).

Espécies de *Acinetobacter* de origem humana crescem bem em meios sólidos como ágar sangue de carneiro e ágar triptona de soja, a uma temperatura de incubação de 37°C. Estes microrganismos formam colônias suaves, às vezes mucóides, brancas acinzentadas. As colônias das cepas do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* assemelham-se às de *Enterobacteriaceae*, com diâmetro de 1,5 a 3 mm depois da cultura em overnight, enquanto maioria das outras espécies de *Acinetobacter* apresenta colônias menores e mais translúcidas (Peleg et al., 2008).

Estas bactérias apresentam resistência a desinfetantes e à ação de vários antimicrobianos (Wisplinghoff et al., 2007; Peleg et al., 2008). Podem se manter viáveis em superfícies secas e resistir ao dessecação. Isto somado à capacidade, em especial de *A. baumannii*, de formar biofilmes em superfícies, favorece sua persistência no ambiente por longos períodos, principalmente no ambiente hospitalar (Gales et al., 2001; Peleg et al., 2008).

Estes microrganismos podem ser encontrados no solo, água doce ou salina, em esgotos e ocasionalmente em alimentos. Podem ainda estar presentes em solventes orgânicos aromáticos como o petróleo (Baumann, 1968; Juni, 1978; Bifulco et al., 1989; Petukhov et al., 2000). Várias espécies também têm sido isoladas de animais, vegetais, da pele e do trato gastrointestinal de seres humanos saudáveis (Dijkshoorn et al., 2007; Peleg et al., 2008).

Acinetobacter sp. é considerado um patógeno oportunista, relacionado a uma série de infecções nosocomiais, incluindo bacteremia, pneumonia, infecções do trato urinário, meningites e infecções de pele,

acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos e internados em unidades de terapia intensiva (UTI) (Dijkshoorn et al., 2007; Chusri et al., 2009).

Vários fatores de patogenicidade e virulência já foram identificados em *A. baumannii* entre eles podem ser citados, a adaptação de *A. baumannii* a condições adversas; capacidade de crescer sob condições de déficit de ferro; adesão às células epiteliais através do *pili*; presença de proteínas de membrana externa que induzem a apoptose de células epiteliais; possui na parede celular um lipopolissacarídeo que permite a resistência ao complemento e apresenta capacidade de aderência a superfícies pela formação de biofilme, o que contribui para seu potencial de transmissibilidade por objetos inanimados (Choi et al., 2005; Joly-Guillou, 2005; Dijkshoorn et al., 2007; Lee et al., 2008; Peleg et al., 2008).

A ocorrência de surtos recorrentes e a disseminação no ambiente clínico de *Acinetobacter* sp. têm sido relacionadas à contaminação de equipamentos como respiradores, ar-condicionado, equipamentos para diagnóstico por imagem, bancadas, leitos e ventiladores e também através das mãos colonizadas dos próprios profissionais da saúde (Bernards et al., 2004; Dijkshoorn et al., 2007; Peleg et al., 2008).

A. baumannii é o segundo bacilo Gram-negativo não-fermentador mais frequentemente envolvido em infecções hospitalares, superado apenas pelo gênero *Pseudomonas*. Surtos causados por *Acinetobacter* sp. são relatados mundialmente, sendo a espécie clínica *A. baumannii* considerada a mais importante (Dijkshoorn et al., 2007; Peleg et al., 2008).

A colonização por *A. baumannii* é mais prevalente do que a infecção, mesmo em pacientes suscetíveis. Porém quando estabelecida a infecção, sua progressão pode ser severa porque o tratamento tem se tornado difícil devido à capacidade que o gênero *Acinetobacter* tem de expressar fenótipo de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, o que representa um grave problema clínico tanto pela falta de terapias eficazes, como pelo aumento da incidência de cepas multirresistentes (Sader et al., 1999; Joly-Guillou, 2005; Dijkshoorn et al., 2007; Peleg et al., 2008).

O primeiro exemplar de um microrganismo pertencente ao gênero *Acinetobacter*, originalmente nomeado de *Micrococcus calcoaceticus*, foi isolado de uma amostra de solo pelo microbiologista e botânico holandês Martinus Willem Beijerinck em 1911 (Chung & Ferris, 1996; Towner, 2009; Howard et al., 2012). Ao longo das décadas seguintes, membros do gênero *Acinetobacter* foram classificados com diferentes nomes, sendo este gênero proposto apenas em 1954, por Brisou e Prevot, para os microrganismos não móveis dentro do gênero *Achromobacter* (Brisou & Prevot, 1954). *Acinetobacter* é uma palavra derivada do grego "akineto" que significa não móvel e "bakter" que significa bactéria, por isso esta designação foi escolhida para descrever este gênero (Howard et al., 2012).

No entanto, apenas a partir de 1968 é que essa nomenclatura tornou-se mais aceita e em 1971, o gênero *Acinetobacter* foi oficialmente reconhecido pelo Subcomitê de Taxonomia de *Moraxella* e Bactérias Relacionadas (Baumann, 1968; Howard et al., 2012).

Atualmente o gênero *Acinetobacter* é classificado no reino *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Pseudomonadales* e família *Moraxellaceae* (Rossau et al., 1991; Vaneechoutte et al., 2011). Até o momento, foram descritas 33 espécies pertencentes ao gênero *Acinetobacter* (Tabela 1). Outros 28 grupos genômicos ou genoespécies, ainda aguardam uma posição taxonômica definitiva quanto a sua nomenclatura e 21 cepas de *Acinetobacter* sp. não foram incluídas em nenhuma espécie ou genoespécie já descritas (Towner, 2009).

Recentemente a nomenclatura de quatro genoespécies de importância clínica foi definida: *A. pittii* (antes denominada *A.* genoespécie 3), *A. nosocomialis* (*A.* genoespécie 13TU), *A. bereziniae* (*A.* genoespécie 10) e *A. guillouiae* (*A.* genoespécie 11) (Nemec et al., 2010; Nemec et al., 2011).

A. baumannii, *A. pittii*, *A. nosocomialis* e *A. calcoaceticus* são espécies extremamente relacionados e difíceis de serem distinguidas umas das outras pelas suas características fenotípicas, por isso em 1991, foi proposto agrupá-las no complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* (Gerner-Smidt et al., 1991; Peleg et al., 2008). Como neste grupo estão as três espécies de maior relevância clínica *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* e a espécie ambiental *A. calcoaceticus*, frequentemente isolada do solo e água e até então não relacionada a doenças clínicas graves, o uso da designação complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* pode não ser apropriado no contexto clínico, pois o diagnóstico preciso não é muitas vezes conseguido. Por ser a cepa mais importante e prevalente, *A. baumannii* pode ser reportada erroneamente, ofuscando as demais espécies do complexo (Peleg et al., 2008, Towner, 2009).

Estudos sugerem que para se referir às três espécies, *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*, o mais apropriado seria utilizar o termo "grupo *A. baumannii*", pois estas espécies têm importantes características clínicas e epidemiológicas e também porque terminaria com a confusão resultante da inclusão de uma cepa ambiental dentro do mesmo grupo (Dijkshoorn et al., 1993; Seifert & Gerner-Smidt, 1995; Lim et al., 2007).

TABELA 1: Nomenclatura atual e prévia e referência bibliográfica das 33 espécies de *Acinetobacter* descritas.

Nomenclatura atual	Nomenclatura prévia	Referência
<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. genoespécie 1, Micrococcus calcoaceticus, Moraxella calcoacetica</i>	Bouvet & Grimont (1986)
<i>A. baumannii</i>	<i>A. genoespécie 2, Bacterium anitratum</i>	Bouvet & Grimont (1986)
<i>A. pittii</i>	<i>A. genoespécie 3, Herellea vaginicola</i>	Nemec et al. (2011)
<i>A. nosocomialis</i>	<i>A. genoespécie 13TU, Acinetobacter anitratus</i>	Nemec et al. (2011)
<i>A. haemolyticus</i>	<i>A. genoespécie 4, Achromobacter haemolyticus</i>	Bouvet & Grimont (1986)
<i>A. junii</i>	<i>A. genoespécie 5, Achromobacter citrocaligenes</i>	Bouvet & Grimont (1986)
<i>A. johnsonii</i>	<i>A. genoespécie 7, Achromobacter metalcaligenes</i>	Bouvet & Grimont (1986)
<i>A. lwoffii</i>	<i>A. genoespécie 8/8TU, Moraxella lwoffii</i>	Bouvet & Grimont (1986)
<i>A. bereziniae</i>	<i>A. genoespécie 10, Achromobacter anitrata</i>	Nemec et al. (2010)
<i>A. guillouiae</i>	<i>A. genoespécie 11</i>	Nemec et al. (2010)
<i>A. radioresistens</i>	<i>A. genoespécie 12</i>	Nishimura et al. (1988)

Continuação TABELA 1: Nomenclatura atual e prévia e referência bibliográfica das 33 espécies de *Acinetobacter* descritas.

Nomenclatura atual	Nomenclatura prévia	Referência
<i>A. ursingii</i>	-	Nemec et al. (2011)
<i>A. schindleri</i>	-	Nemec et al. (2011)
<i>A. parvus</i>	-	Nemec et al. (2003)
<i>A. baylyi</i>	-	Carr et al. (2003)
<i>A. brisouii</i>	-	Anandham et al. (2010)
<i>A. rudis</i>	-	Vaz-Moreira et al. (2011)
<i>A. soli</i>	-	Kim et al. (2008)
<i>A. indicus</i>	-	Malhotra et al. (2012)
<i>A. antiviralis</i>	-	Lee et al. (2009)
<i>A. bouvetii</i>	-	Carr et al. (2003)
<i>A. towneri</i>	-	Carr et al. (2003)
<i>A. tandoii</i>	-	Carr et al. (2003)
<i>A. tjernbergiae</i>	-	Carr et al. (2003)
<i>A. gerneri</i>	-	Carr et al. (2003)
<i>A. beijerinckii</i>	-	Nemec et al. (2009)
<i>A. gyllenbergii</i>	-	Nemec et al. (2009)
<i>A. venetianus</i>	-	Vaneechoutte et al. (2009)
<i>A. marinus</i>	-	Yoon et al. (2007)
<i>A. seohaensis</i>	-	Yoon et al. (2007)
<i>A. oryzae</i>	-	Chaudhary et al. (2012)
<i>A. oleivorans</i>	-	Kang et al. (2011)
<i>A. kyonggiensis</i>	-	Lee & Lee (2010)

2.2 Métodos de identificação de espécies de *Acinetobacter*

A identificação em nível de espécie de isolados de *Acinetobacter* sp. em laboratórios clínicos é por vezes questionada (Gerner-Smidt et al., 1991). Do ponto de vista clínico e de controle de infecção, é importante a distinção entre as espécies do grupo *A. baumannii* (*A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*) e as fora do grupo, que raramente têm implicações no controle de infecção, geralmente são suscetíveis a vários antimicrobianos e as infecções que causam, são frequentemente benignas. Já do ponto de vista relacionado à pesquisa, estudos clínicos usando métodos adequados para a identificação das espécies de *Acinetobacter*, até mesmo a diferenciação entre as três espécies do grupo *A. baumannii*, são necessários para o conhecimento da epidemiologia, patogenicidade e impacto clínico das diversas espécies dentro do gênero *Acinetobacter* (Peleg et al., 2008).

Inclusive a correta identificação das espécies dentro do complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* pode ter implicações na terapia antimicrobiana (Ko et al., 2008). O estudo realizado por Seifert et al. (1993) demonstrou que espécies de *Acinetobacter* pertencentes ao complexo são geralmente mais resistentes aos antimicrobianos do que outras espécies de *Acinetobacter*. Também são relatadas diferenças na susceptibilidade antimicrobiana entre as espécies do complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* o que evidencia ainda mais a importância da correta identificação destes microrganismos uma vez que erros podem interferir diretamente no diagnóstico, tratamento e controle de infecções causadas por *Acinetobacter* sp. (Nemec et al., 2003; Dijkshoorn et al., 2007; Dijkshoorn & Nemec, 2008; Peleg et al., 2008; Nemec et al., 2011).

Porém a utilização somente de provas bioquímicas para a identificação de espécies de *Acinetobacter*, na maioria das vezes não é suficiente (Dijkshoorn et al., 2007). O esquema de identificação fenotípica proposto por Bouvet e Grimont em 1986 e aprimorado em 1987 permite a diferenciação entre 11 das 12 espécies inicialmente descritas (Bouvet & Grimont, 1986) e conseguiu fazer a identificação correta de 136 isolados de *Acinetobacter* recuperados a partir de amostras de pele humana (Seifert et al., 1997), porém não permite a identificação de espécies descritas mais recentemente, particularmente as espécies dentro do complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii*, não sendo capaz de distinguir *A. baumannii* de *A. nosocomialis* e nem *A. calcoaceticus* de *A. pittii* (Gerner-Smidt et al., 1991).

Até mesmo os sistemas de identificação comerciais manuais e semi-automatizados, geralmente utilizados no diagnóstico em microbiologia, apresentam problemas na identificação devido seu limitado banco de dados e os seus substratos utilizados não serem adaptados especificamente para a identificação de espécies de *Acinetobacter*. Tais sistemas não são capazes de diferenciar as espécies do grupo *A. baumannii*, conseqüentemente *A. nosocomialis* e *A. pittii* são reportadas como *A. baumannii* (Dijkshoorn et al., 1993; Bernards et al., 1995; Horrevorts et al., 1995; Seifert & Gerner-Smidt, 1995; Bernards et al., 1996; Lim et al., 2007;).

Para suprir as falhas na identificação destes microrganismos por métodos fenotípicos, vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos e validados para a identificação de espécies de *Acinetobacter* (Nemec et al., 2003; Dijkshoorn et al., 2007; Peleg et al., 2008). A técnica de hibridização

DNA-DNA é considerada padrão ouro para a identificação de espécies de *Acinetobacter* (Peleg et al., 2008). Por este método genomas inteiros são comparados e a similaridade é dada pela porcentagem de ligação relativa ou pelas diferenças na estabilidade térmica dos híbridos. Porém resultados diferentes de hibridização podem ser obtidos quando métodos distintos são aplicados, além de ser uma técnica trabalhosa, é realizada em uma escala limitada o que impede seriamente o desenvolvimento de taxonomias bacterianas (Dijkshoorn & Nemeč, 2008).

Apesar da classificação atual das espécies de *Acinetobacter* ter sido realizada por hibridização DNA-DNA, não é uma metodologia a ser considerada como opção para o delineamento de novas espécies, pois existem muitos grupos de hibridização dentro do gênero *Acinetobacter* além de ser um processo bastante complexo e inadequado para se aplicar rotineiramente em laboratórios de microbiologia (Bouvet & Grimont, 1986; Stackebrandt et al., 2002; Peleg et al., 2008).

Para a identificação de *A. baumannii* tem-se aplicado a detecção do gene *bla*_{OXA-51} que codifica uma carbapenemase intrínseca desta espécie (Turton et al., 2006). Porém este gene recentemente foi identificado em *A. nosocomialis*, sendo assim, não é confiável para a identificação da espécie *A. baumannii* (Chen et al., 2010).

A tipificação por sequenciamento de multilocus (MLST) é uma técnica em que sequências de genes “housekeeping” de cepas dentro de uma espécie são analisadas (Dijkshoorn & Nemeč, 2008). Tem sido considerado um método com elevado poder discriminatório entre as espécies dentro do

complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* baseando-se na sequência de regiões internas de sete genes housekeeping (*gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* and *rpoD*) (Bartual et al., 2005; Almeida & Araújo, 2013). Dois sistemas que são primeiramente para estudos da diversidade intraespécies têm sido desenvolvidos para *A. baumannii*, um deles também foi aplicável para a identificação das espécies estreitamente relacionadas *A. pittii* e *A. nosocomialis*. Contudo a identificação de outras espécies do gênero depende de encontrar sítios consensos para oligonucleotídeos em regiões ricas em informações de genes adequados (Dijkshoorn & Nemec, 2008).

A análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) é um método que tem se mostrado bastante útil na identificação de *Acinetobacter* sp. Nele são obtidos fragmentos de restrição a partir da restrição com cinco enzimas (*CfoI*, *AluI*, *MboI*, *RsaI* e *MspI*) do produto resultante da amplificação da subunidade 16S do RNA ribossomal. Os perfis de restrição são analisados e comparados com um banco de dados de perfis de cepas referência de espécies descritas (Dijkshoorn & Nemec, 2008). Entretanto já foi observada a ocorrência de múltiplos perfis em cepas da mesma espécie, indicando polimorfismo intra-espécie, e perfis comuns entre espécies diferentes, sendo então necessário um banco de dados extenso de perfis apresentando variações intra e inter-espécies, para a identificação correta de isolados a serem estudados (Vanechoutte et al., 1995; Dijkshoorn & Nemec, 2008).

Outro método utilizado é a análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos (AFLP) (Janssen et al., 1996). Trata-se de um método de alta resolução que pode ser usado em qualquer DNA sem considerar a sua origem.

Nele há a digestão do DNA por duas enzimas de restrição com adição de adaptadores aos fragmentos de restrição e posterior amplificação destes fragmentos, resultando em perfis que são então analisados (Vos et al., 1995). Esta técnica tem sido considerada uma das mais importantes em resolver a diversidade dentro do gênero *Acinetobacter*. A desvantagem do método é que devido à dificuldade de padronização os resultados não podem ser comparados entre laboratórios (Janssen et al., 1997; Dijkshoorn et al., 2007).

Mais recentemente a técnica de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF MS) tem sido aplicada na diferenciação de espécies de *Acinetobacter* (Espinal et al., 2011; Alvarez-Buylla et al., 2012). No MALDI-TOF MS com pequenas quantidades de amostra e em minutos há a produção de assinaturas de impressão proteica que podem rapidamente ser comparadas com um banco de dados do aparelho (Sogawa et al., 2011). Esta técnica mostrou-se muito eficiente na detecção de *A. baumannii* (Kempf et al., 2012) e na diferenciação das demais espécies do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (Espinal et al., 2011). Comparado com outros métodos convencionais de diagnóstico em laboratório de rotina como ARDRA, *recA* e sequenciamento do ITS, MALDI-TOF MS revelou-se um método robusto, de baixo custo e acurácia similar, sendo proposto como a técnica ideal para testes em laboratório clínicos. Porém para que isso aconteça é necessário um melhoramento no seu banco de dados. (Espinal et al., 2011). Além disso, no estudo de Alvarez-Buylla et al. (2012), espécies fora do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* o MALDI-

TOF MS não foi capaz de diferenciar, o que evidencia a necessidade de mais estudos com esta técnica.

A análise da sequência do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal é geralmente utilizada na identificação da maioria das espécies bacterianas, porém falha na distinção de espécies estreitamente relacionadas de *Acinetobacter* pela baixa natureza polimórfica deste gene nestes microrganismos sendo assim, não pode substituir o método padrão de hibridização DNA-DNA (La Scola et al, 2006). Em estudo de La Scola et al. (2001) isolados foram identificados erroneamente como *A. calcoaceticus* em vez de *A. baumannii* pela comparação da sequência do gene 16S rRNA (La Scola, 2006).

Frente a isso, outros dois genes tem sido propostos para a identificação de espécies de *Acinetobacter*. Entre eles o gene *recA*, codificador da recombinase A (Krawczyk et al., 2002), e o gene *gyrB*, codificador da subunidade β da DNA girase (Yamamoto et al., 1999). Contudo, ainda não há disponível a sequência dos genes *gyrB* e *recA* de dez espécies recentemente descritas de *Acinetobacter* o que limita o uso destes genes para a comparação de diferentes espécies de *Acinetobacter* (Carr et al., 2003; Nemeč et al., 2003; La Scola et al., 2006).

Muitos estudos demonstram a utilidade de sequências do gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) para a identificação e classificação taxonômica de várias espécies bacterianas (Nemeč et al., 2003) inclusive de *Acinetobacter* sp. (Gundi et al., 2009). O trabalho de La Scola et al., (2006) reporta quatro regiões altamente variáveis do gene *rpoB*, incluindo

duas áreas polimórficas dentro do gene (zona 1, 350 bp e zona 2, 450 bp) e duas regiões intergênicas (uma de 301- 310 bp entre *rplL* e *rpoB* a outra de 86-177 bp entre *rpob* e *rpoC*) (Figura 1). Neste estudo 24 espécies de *Acinetobacter* foram identificadas utilizando as quatro regiões do gene e conclui-se que todas tiveram alto poder discriminatório, sendo a zona 1 proposta como primeira escolha por ser a menor e ter permitido a identificação de 20 das 24 espécies de *Acinetobacter*. Também é proposto que se a sequência da zona 1 for similar entre *A. grimontii* e *A. junii*, seja também estudada a sequência da zona 2 para fazer a distinção destas duas espécies. E se a sequência da zona 1 entre *A. baylyi* e a espécie genômica 9 for similar, utilizar a sequência espaçadora *rpob-rpoC* para fazer a diferenciação clara das duas espécies (La Scola et al, 2006). Em 2009, Gundi e colaboradores validaram a técnica analisando um número maior de isolados de *Acinetobacter* sp. e confirmando que esta é uma ferramenta molecular simples e confiável para a identificação de espécies de *Acinetobacter* sp. incluindo as pertencentes ao complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* (Gundi et al., 2009). Inclusive sendo atualmente recomendada como prova confirmatória para identificação a nível de espécie de *Acinetobacter* (La Scola et al., 2006).

Além das metodologias já citadas, outras já foram sugeridas para a identificação das espécies de *Acinetobacter*, como ribotipagem (Gerner-Smidt et al., 1991), sequenciamento das regiões espaçadoras intergênicas da porção 16S-23S ribossomal (Chang et al., 2005), análise de restrição das regiões espaçadoras intergênicas da porção 16S-23S ribossomal (Dolzani et al., 1995), análise dos perfis das proteínas do envelope celular (Dijkshoorn et al., 1990)

e análise de anticorpos monoclonais para antígeno O (Pantophlet et al., 2002). Contudo tais metodologias ou não conseguem diferenciar as espécies do complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* ou só identificam estas e não as outras espécies do gênero. Além de algumas terem alto custo e não serem viáveis para uma rotina laboratorial (Gerner-Smidt et al., 1991; Dolzani et al., 1995; Yamamoto et al., 1999; Krawczyk et al., 2002; Chang et al., 2005; Peleg et al., 2008).

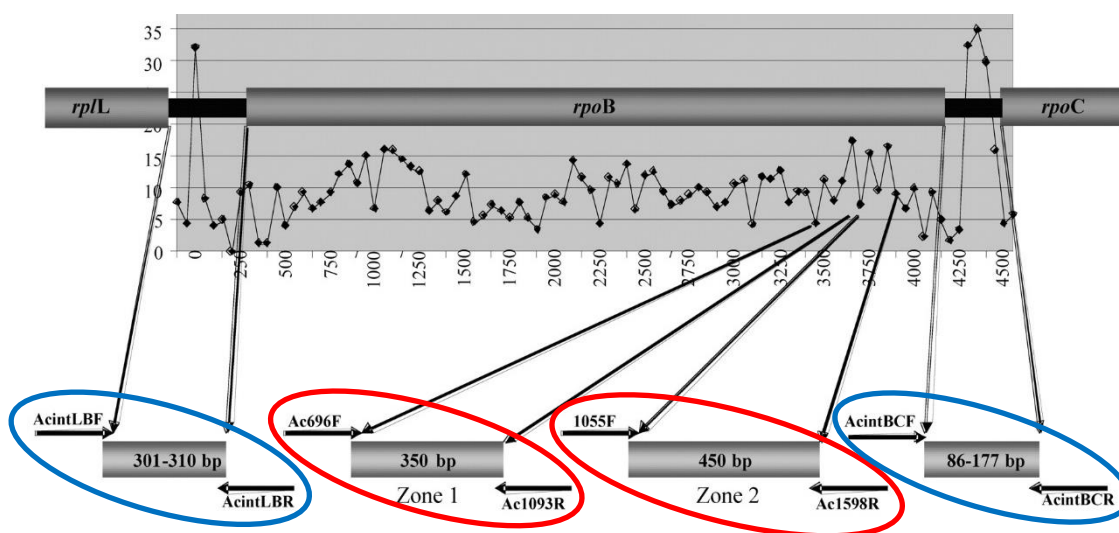


FIGURA 1: Representação gráfica de sítios variáveis no gene *rpoB* (circulados em vermelho) e seqüências espaçadoras (circuladas em azul) de espécies de *Acinetobacter*. O eixo X indica a posição dos nucleotídeos e o eixo Y indica a porcentagem de variabilidade por 50 nucleotídeos. Oligonucleotídeos que amplificam cada região também são demonstrados. Figura adaptada de La Scola et al. (2006).

2.3 Resistência antimicrobiana em *Acinetobacter* sp.

O tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* sp. é dificultado pela resistência intrínseca destes microrganismos e pela habilidade de adquirirem prontamente novos mecanismos de resistência a antimicrobianos (Chusri et al., 2009).

Este gênero possui natureza sapróbia e por longos períodos esteve exposto a organismos produtores de antimicrobianos no ambiente do solo, possivelmente por este motivo, tem propensão em expressar resistência aos antimicrobianos de forma muito rápida. Esta característica contrasta com a de outras bactérias de importância clínica, que parecem precisar de mais tempo para adquirir mecanismos de resistência efetivamente elevada (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996).

Desde 1970, isolados de *Acinetobacter* sp. têm acumulado resistência sucessiva às penicilinas, cefalosporinas, quinolonas e aminoglicosídeos. Como consequência, os carbapenêmicos passaram a ser utilizados como terapia de escolha para infecções mais graves causadas pelo gênero (Coelho et al., 2004). Antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos são β -lactâmicos de amplo espectro derivados da tienamicina que apresentam certa estabilidade frente à maioria das β -lactamases, inclusive às β -lactamases de amplo espectro (ESBL) (Rodloff et al., 2006).

Porém mais recentemente, o aumento da frequência de cepas de *Acinetobacter* sp. resistentes aos carbapenêmicos, particularmente ao imipenem, tem causado maior preocupação pelo fato destes antibacterianos serem considerados uma das últimas opções para o tratamento de infecções

por bacilos Gram-negativos não fermentadores multirresistentes (Walsh et al., 2002; Sinha & Srinivasa, 2007). Para o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos resistentes aos carbapenêmicos restam apenas a ampicilina-sulbactam, que é um antimicrobiano ao qual isolados de *Acinetobacter* já apresentam resistência e a polimixina, considerado um antimicrobiano potencialmente tóxico ao paciente (Gales et al., 2001).

A capacidade de sobreviver no ambiente e em reservatório humano, a aquisição de elementos genéticos, como plasmídeos, transposons e integrons bem como a resistência intrínseca do gênero, são alguns dos fatores que favorecem o fenótipo de multirresistência (Vila et al., 2007).

O uso extensivo de antimicrobianos no ambiente hospitalar tem contribuído para o aparecimento de isolados de *A. baumannii* multirresistentes (Smolyakov et al., 2003). A exposição contínua e excessiva a antibióticos de amplo espectro exerce uma pressão seletiva sobre *Acinetobacter* possibilitando desta forma, a sobrevivência de estirpes mais resistentes e a disseminação de mecanismos de resistência entre diferentes bactérias (Peleg et al., 2008).

Além disso, os pacientes têm importante papel epidemiológico em grandes surtos, pois a elevada taxa de portadores fecais em UTI está fortemente associada ao trato digestivo como reservatório de infecções por *A. baumannii*, assim como em outros surtos infecciosos por bacilos Gram-negativos (Corbella et al., 1996). Tais condições seletivas do ambiente clínico podem levar ao aumento da frequência de bactérias resistentes a antimicrobianos, que acabam sendo liberadas no esgoto hospitalar (Prado et al., 2008).

O efluente hospitalar, portanto atua como fonte de contaminação, pois nele concentram-se os dejetos de pacientes que expressam morbidade variável (Fayer et al., 2004). Estudos demonstram que o esgoto hospitalar exibe níveis mais elevados de bactérias entéricas resistentes a antimicrobianos do que efluentes provenientes de outras fontes e, que a concentração de antimicrobianos na água que recebe este esgoto também é superior, proporcionando um ambiente com forte pressão seletiva (Linton et al., 1974).

Desta forma, o ambiente aquático não constitui somente um caminho de disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos, mas também a rota pela qual genes de resistência são introduzidos no ecossistema bacteriano natural e onde ocorrem trocas de genes entre microrganismos de diferentes origens. Dessa interação de bactérias humanas, animais e ambientais ocorre a evolução da resistência (Baquero et al., 2008).

2.4 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos em *Acinetobacter* sp.

Os β -lactâmicos são divididos em cinco subclasses: penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos e carbapenens. Todos os β -lactâmicos têm como mecanismo de ação a ligação às proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), localizadas na membrana interna bacteriana, interferindo na última etapa da síntese de peptidoglicano por inibição da transpeptidase (Sauvage et al., 2008; Llarrull et al., 2010). Portanto para ter ação antimicrobiana os β -lactâmicos precisam penetrar na parede celular para se ligar às PBPs. Porém esse processo torna-se mais difícil em bactérias Gram

negativas, como *A. baumannii*, pois sua parede celular possui uma camada de lipopolissacarídeos ancorada na membrana externa que interfere na penetração de fármacos hidrofílicos. Além disso, são necessárias porinas que permitam que o β -lactâmico penetre na célula (Nikaido & Vaara, 1985; Nikaido, 1992; Delcour, 2009).

A resistência bacteriana aos β -lactâmicos pode estar relacionada com a degradação enzimática do antimicrobiano pela produção de β -lactamases, perda ou diminuição da expressão das proteínas de membrana externa, a alteração da afinidade ou expressão das PBPs e a hiperexpressão de sistemas de efluxo (Llarrull et al., 2010).

2.4.1 β -lactamases

O mecanismo mais comum de resistência aos β -lactâmicos é a síntese de β -lactamases, enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, inativando estes antimicrobianos. Os genes que codificam as β -lactamases podem estar localizados no cromossomo bacteriano, em plasmídeos ou transposons (Bush et al., 1995, Turton et al., 2006).

Em bactérias Gram negativas, as β -lactamases encontram-se no espaço periplasmático, onde podem atingir altas concentrações e assim agir de forma muito eficiente sobre os β -lactâmicos, antes que estes alcancem o seu sítio alvo, as PBPs (Livermore, 1993).

As β -lactamases podem ser classificadas de duas maneiras; uma é com base nas suas propriedades funcionais (classificação de Bush), em que as β -lactamases são classificadas em 3 grupos de enzimas relacionadas aos seus

substratos e perfis de inibição, na qual o grupo 1 refere-se às cefalosporinases; grupo 2 refere-se às penicilinases, cefalosporinases e β -lactamases de amplo espectro e o grupo 3 refere-se às metalo- β -lactamases (Bush et al.; 1995). Em 2010 a classificação de Bush foi atualizada com a adição de subgrupos (Bush & Jacoby, 2010).

A outra classificação, baseada na estrutura molecular (classificação de Ambler), foi proposta em 1980, quando somente quatro sequências de aminoácidos de β -lactamases eram conhecidas. As enzimas foram então agrupadas em classe A das penicilinases e classe B das metalo- β -lactamases. Posteriormente foram incluídas na classificação a classe C das cefalosporinases e classe D das oxacilinases (Jaurin & Grundstrom, 1981; Bush et al.; 1995).

Em *A. baumannii* oxacilinases (OXA) e metalo- β -lactamases são as enzimas mais comumente identificadas (Poirel & Nordmann, 2006).

2.4.2 β –lactamases de classe C – AmpC cefalosporinases

As β –lactamases do tipo AmpC estão incluídas no grupo 1 de Bush (Bush et al., 1995) e classe C de Ambler (Ambler, 1980). O gene que as codifica pode estar inserido no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos (Philippon et al., 2002; Jacoby, 2009).

Em *A. baumannii*, cefalosporinases AmpC são cromossomicamente codificadas, também conhecidas como cefalosporinases derivadas de *Acinetobacter* (ADCs) (Hujer et al., 2005). A hiperprodução destas enzimas em *A. baumannii* é devido a presença da sequência de inserção (IS) IS*Aba1* à

montante do gene (Corvec et al., 2003; Boo et al., 2009). A presença deste elemento está relacionada ao aumento da expressão do gene AmpC e à resistência às cefalosporinas de amplo espectro (Corvec et al., 2003; Ruiz et al., 2007). Porém não são capazes de hidrolisar cefepime e carbapenêmicos (Hujer et al., 2005). Já foram descritas variantes ADC-33 (Rodríguez-Martinez et al., 2010) e ADC-56 (Tian et al., 2011) como sendo AmpCs de espectro ampliado conferindo resistência às cefalosporinas de quarta geração.

2.4.3 β -lactamases de Espectro Estendido – ES β L

As ES β Ls estão classificadas no grupo 2be de Bush (Bush et al., 1995) e na classe A de Ambler (Ambler, 1980). Estas enzimas conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e ao aztreonam, mas não agem sobre cefamicinas e os carbapenens (Turner, 2005).

ES β Ls são raramente descritas em *A. baumannii* possivelmente porque a detecção de sua real prevalência é prejudicada pela dificuldade de detectá-las laboratorialmente, principalmente na presença de uma AmpC, que pode interferir no teste de ES β Ls (Beceiro et al., 2008; Peleg et al., 2008). Apesar disso, diversas variantes de ES β Ls têm sido descritas em *Acinetobacter* sp. (Peleg et al., 2008).

2.4.4 Carbapenemases de Classe A

As carbapenemases de classe A (penicilinases) possuem serina no seu sítio ativo (Jin et al., 2004). Estão incluídas no grupo 2f de Bush (Bush et al., 1995) e na classe A de Ambler (Ambler, 1980). Estas enzimas podem ser

codificadas tanto por cromossomos quanto por plasmídeos. Têm a propriedade de hidrolisar, ao menos parcialmente, imipenem, meropenem entre outras penicilinas e cefalosporinas (Jin et al., 2004).

Em *A. baumannii*, as carbapenemases de classe A são raras, sendo mais relatadas em isolados de enterobactérias, destacando-se as β -lactamases do tipo KPC cujas variantes já foram observadas em *A. baumannii* em Porto Rico (Cuzon et al., 2010; Robledo et al., 2010).

Outras carbapenemases de classe A foram também relatadas em *A. baumannii* GES-11 (França - Moubareck et al., 2009; Bélgica – Bogaerts et al., 2010) e GES-12 e GES-14 (Bélgica - Bogaerts et al., 2010; França - Bonnin et al., 2011).

2.4.5 Carbapenemases de Classe B - Metallo- β -lactamases

As Metallo- β -lactamases foram classificadas no grupo 3 de Bush (Bush et al., 1995) e na classe B de Ambler (Ambler, 1980). Posteriormente esta classificação foi atualizada a qual foram incluídos três subgrupos (3a, 3b e 3c) correspondentes às três subclasses moleculares (B1, B2 e B3) respectivamente (Bush & Jacoby, 2010). Estas enzimas caracterizam-se por apresentarem sítio ativo dependente do cátion divalente do elemento zinco (Zn^{2+}), o principal cofator (Queenan & Bush, 2007). São inibidas por EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético) ou compostos derivados do tiol e não são inibidas por inibidores convencionais de serino- β -lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Bebrone, 2007; Queenan & Bush, 2007).

Todos os antimicrobianos β -lactâmicos comercialmente disponíveis são hidrolisados pelas metalo- β -lactamases, sendo a única exceção o monobactam aztreonam (Bush, 2001).

As M β LS são constitutivamente expressas em diversas bactérias, entretanto a maioria delas é de pouca importância clínica (Livermore & Woodford, 2000; Maltezou, 2009). De maior relevância clínica são as variantes de M β LS adquiridas, que são codificadas por cassetes gênicos localizados em elementos genéticos móveis, podendo estar inseridos no cromossomo ou em plasmídeos bacterianos (Walsh et al., 2005).

As M β LS adquiridas são codificadas por genes *bla*, encontrados em integrons de classe 1 e movem-se entre microrganismos, inseridos em plasmídeos ou transposons, o que facilita a disseminação horizontal entre cepas da mesma espécie ou até mesmo entre espécies diferentes. Frequentemente os genes *bla* encontram-se associados aos genes tipo *aac*- ou *aad*- que conferem resistência a aminoglicosídeos, ou estão associados a genes que codificam ES β LS, ou genes tipo OXA, TEM e CTX (Rasmussen et al., 1997; Livermore & Woodford, 2000; Queenan & Bush, 2007; Maltezou, 2009).

Já foram identificadas as seguintes famílias de M β LS adquiridas: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), NDM (New Delhi metalo- β -lactamase), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase), GIM (*Germany* imipenemase), SIM (*Seoul* imipenemase), AIM (Australian imipenemase) e KHM (Kyorin Hospital metalo- β -lactamase) (Queenan & Bush, 2007; Maltezou, 2009; Cornaglia et al., 2011).

As enzimas IMP e VIM são as MβLs mais prevalentes e estão distribuídas em diversos países. As demais enzimas aparentemente estão restritas aos seus países de origem (Queenan & Bush, 2007; Maltezou, 2009). No Brasil, até o momento a única MβL em *Acinetobacter baumannii* relatada, foi a IMP-1, relacionada a um surto na cidade de São Paulo no ano de 2001 (Tognim et al., 2006).

Outras MβLs já foram descritas em *A. baumannii* em outros países (Cornaglia et al., 2011; Ghazawi et al., 2012). Ainda, diferentes MβLs foram relatadas em outras espécies de *Acinetobacter* sp.: IMP-1 em *A. ursingii* (Japão – Endo et al., 2012), VIM-2 e SIM-1 em *A. bereziniae* (Coreia do Sul - Lee et al., 2010), IMP-4 em *A. junii* (Austrália - Peleg et al., 2006), NDM-1 em *A. lwoffii* e NDM-1 em *A. pittii* (China - Fu et al., 2012).

2.4.6 Carbapenemases de classe D – oxacilinas

As oxacilinas são enzimas pertencentes à classe D de Ambler (Ambler, 1980) e classificadas em três subgrupos de Bush, 2d (oxacilinas de espectro restrito capazes de hidrolisar oxacilina e cloxacilina e encontradas em enterobactérias), 2de (oxacilinas do tipo ESβL que hidrolisam as oximinocefalosporinas e cefepime e presentes principalmente em *P. aeruginosa*) e 2df (conhecidas como “Carbapenem-Hydrolyzing Class D β-lactamases” (CHDLs), encontradas quase que exclusivamente em *A. baumannii* e hidrolisam fracamente os carbapenens (Bush & Jacoby, 2010; Poirel et al., 2010).

Juntamente com as enzimas das classes A e C, as oxacilinases são serino- β -lactamases. Geralmente não são inibidas por inibidores de serino- β -lactamases como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam, porém são inibidas por cloreto de sódio (NaCl) a 100mM (Poirel et al., 2010).

Os subtipos de β -lactamases do tipo OXA com elevada similaridade genética encontram-se em um mesmo subgrupo filogenético, sendo as oxacilinases com atividade de carbapenemase, as CHDLs, divididas em 9 clusters, destacando os 6 clusters já descritos em *A. baumannii*, OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, OXA-143 e OXA-182 (Brown & Amyes, 2006; Walther-Rasmussen & Hoiby, 2006; Queenan & Bush, 2007; Higgins et al., 2009; Kim et al., 2010; Poirel et al., 2010).

O primeiro isolado de *A. baumannii* com CHDL foi descrito em 1985 no Reino Unido (Paton et al., 1993). Este determinante de resistência codificado por plasmídio (inicialmente denominada de ARI-1) foi observado ser transferível e posteriormente quando sua sequência foi estudada, verificou-se sua similaridade com a família de β -lactamases do tipo OXA, sendo então nomeada de OXA-23 (Donald et al., 2000, Peleg et al., 2008). Esta enzima tem contribuído com a resistência a carbapenêmicos em *A. baumannii* globalmente, sendo provavelmente a CHDL mais prevalente (Queenan & Bush, 2007; Peleg et al., 2008; Poirel et al., 2010).

Assim como outras CHDLs, a OXA-23 hidrolisa fracamente os carbapenens, sendo necessário a presença de uma IS, IS*Aba*1 ou IS*Aba*4 (Poirel & Nordmann, 2006). A importância dos elementos IS para a resistência aos carbapenêmicos é porque codificam uma transposase e, portanto são

móveis e também os elementos IS podem conter regiões promotoras que levam a hiperexpressão de genes de resistência a antimicrobianos downstream a eles (Poirel & Nordmann, 2006; Peleg et al., 2008).

Outras CHDLs descritas são OXA-24 e OXA-58. O cluster OXA-24, juntamente com os clusters OXA-143 e OXA-182 são os únicos cujos genes codificadores dessas enzimas não estão relacionadas a IS, sugerindo que estas enzimas sejam as mais potentes CHDLs em *A. baumannii*. O processo de mobilização destas enzimas ocorre por um processo de recombinação homóloga (Poirel et al., 2010). OXA-58 é frequentemente mediado por plasmídeo, o que pode explicar sua vasta distribuição (Peleg et al., 2008). Estudos demonstraram que o gene *bla*_{OXA-58} pode estar associado a diferentes sequências de inserção, como IS*Aba*1, IS*Aba*2, IS*Aba*3 e IS18 relacionadas ao aumento da expressão do gene que codifica OXA-58 (Poirel & Nordmann, 2006).

A enzima tipo OXA-51 foi descrita como a única que ocorreria naturalmente em *A. baumannii*, codificada por um gene cromossomal e intrínseco a esta espécie, sendo por isso o gene *bla*_{OXA-51} utilizado para a identificação de *A. baumannii* (Walther-Rasmussen & Hoiby, 2006; Queenan & Bush, 2007). Porém recentemente observou-se a presença deste gene tanto no cromossoma como também em plasmídeo em isolados de *A. baumannii* (Chen et al., 2010). Além disso, o gene *bla*_{OXA-51} e “upstream” a ele o elemento IS*Aba*1, foram identificados em um plasmídeo em isolados clínicos de *A. nosocomialis* (Lee et al., 2009; Lee et al., 2012).

O gene *bla*_{OXA-51} precisa estar associado com IS*Aba*1 para aumentar sua expressão e assim contribuir para a resistência aos carbapenêmicos, na ausência deste elemento estudos demonstram que OXA-51 tem mínimo efeito na susceptibilidade aos carbapenêmicos (Poirel & Nordmann, 2006; Walther-Rasmussen & Hoiby, 2006; Queenan & Bush, 2007).

Os clusters OXA-143 e OXA-182 foram os mais recentemente propostos. OXA-143 foi encontrado em um isolado de *A. baumannii* no Brasil em 2009 e OXA-182 foi descrito na Coreia do Sul, em 2010 (Higgins et al., 2009; Kim et al., 2010).

No Brasil, a primeira descrição de OXA-23 em *A. baumannii* foi em 2003 relacionado a um surto na cidade de Curitiba (Dalla-Costa et al., 2003). Em 2009 houve o relato de disseminação de diferentes clones de *A. baumannii* produtores de OXA-23 no Rio de Janeiro (Carvalho et al., 2009). Em 2009 esta enzima também foi identificada em Porto Alegre, e descrita a transmissão de um clone de um isolado resistente aos carbapenêmicos entre profissionais de saúde, equipamentos médicos e pacientes (Martins et al., 2009). Em 2012 foi publicado um estudo em que se identificou a enzima em isolados de *Acinetobacter* sp. em um hospital universitário do Rio de Janeiro (Corrêa et al., 2012). Recentemente, foi identificado o gene *bla*_{OXA-23} em isolados ambientais. Em um estudo, *A. baumannii* foi isolado de água de um rio em Paris (Girlich et al., 2010) e em outro, de amostra de efluente hospitalar em Porto Alegre/RS (Ferreira et al., 2011).

Visto que o progenitor do gene *bla*_{OXA-23} foi identificado como sendo *A. radioresistens*, em que o gene não é expresso ou é pouco expresso (Poirel

et al., 2008) e cuja espécie está raramente relacionada a infecções humanas mas encontra-se no ambiente, é importante enfatizar as trocas genéticas entre espécies de *Acinetobacter*, que podem ter levado a aquisição e a expressão do gene *bla*_{OXA-23} em *A. baumannii*. E isso pode ocorrer no ambiente aquático, onde as duas espécies podem estar próximas (Girlich et al., 2010).

2.4.7 Hiperexpressão de Sistemas de Efluxo

Todas as células possuem sistemas de efluxo responsáveis pelo transporte de substâncias orgânicas tóxicas para fora da célula (Vila et al., 2007). Tais sistemas podem ser específicos para um substrato ou podem transportar diferentes compostos, inclusive diferentes classes de antimicrobianos (Piddock, 2006; Coyne et al., 2011). Por isso a hiperexpressão de sistemas de efluxo está geralmente associada ao fenótipo de multirresistência em bactérias, uma vez que diminuem a concentração de diferentes antimicrobianos no interior da célula, ao mesmo tempo (Piddock, 2006; Vila et al., 2007). Os genes que codificam os sistemas de efluxo em bactérias podem estar localizados no cromossomo ou em plasmídeos (Coyne et al., 2011).

Vários sistemas já foram descritos em *A. baumannii*, porém somente três demonstraram estar relacionados à extrusão de antimicrobianos, os sistemas do tipo Resistance Nodulation Division - RND (AdeABC, AdeIJK e AdeFGH), sistemas do tipo Major Facilitator Superfamily - MFS (CraA e AmvA) e sistema do tipo Multidrug and Toxic Compound Extrusion - MATE (AdeM) e

do tipo Small Multidrug Resistance - SMR (AdeS) (Vila et al., 2007; Coyne et al., 2011).

O sistema de efluxo AdeABC é o mais conhecido e bem estudado (Marchand et al., 2004). É formado por três proteínas: AdeA (proteína de fusão), AdeB (componente *trans*-membrana) e AdeC (proteína de membrana externa). Dois componentes regulam este sistema, o AdeR (repressor) e AdeS (sensor quinase), codificados por genes que estão no operon *adeRS*, localizado a montante do operon *adeABC*, e são transcritos em direção oposta (Marchand et al., 2004; Coyne et al., 2011). Mutações nestes componentes podem alterar os mecanismos regulatórios resultando na hiperexpressão do sistema de efluxo contribuindo para o fenótipo de multirresistência em *A. baumannii* (Marchand et al., 2004).

Quanto a relação entre a resistência aos carbapenêmicos e o sistema AdeABC, esta ainda não é bem conhecida (Peleg et al., 2007). Estudos sugerem que este sistema esteja envolvido na resistência ao meropenem e não ao imipenem em isolados de *A. baumannii* que expressavam OXA-23 e tiveram o gene *adeB* deletado. Observou-se que com *adeB* ausente, os isolados continuaram resistentes, porém houve diminuição de duas vezes da CIM ao meropenem na cepa mutante em relação a cepa selvagem, e não houve nenhuma diferença na CIM ao imipenem (Wong et al., 2009). Além disso, somente a hiperexpressão do sistema AdeABC pode não ser suficiente para determinar elevados níveis de resistência aos carbapenêmicos, sendo necessária a associação com outros mecanismos (Coyne et al., 2011).

O sistema AdelJK está relacionado com a resistência intrínseca somente às cefalosporinas e a outros antimicrobianos não pertencentes a classe dos β -lactâmicos. E nenhum gene regulatório deste sistema foi encontrado (Damier-Piolle et al., 2008). Já o sistema AdeFGH está envolvido com a resistência a vários antimicrobianos, mas com nenhum β -lactâmico (Coyne et al., 2011).

O sistema AdeXYZ foi encontrado em 90% dos isolados de *A. pittii*, em um isolado de *A. nosocomialis* e um isolado de *A. genoespécie 17*. Está relacionado à resistência aos β -lactâmicos, ciprofloxacina, tetraciclina, rifampicina e cloranfenicol. Quanto ao sistema AdeDE foi observado em 70% dos isolados de *A. pittii* e também foi identificado em isolados de *A. nosocomialis* e *A. genoespécie 17*. Este sistema contribui para a resistência aos carbapenêmicos e a ceftazidima, entre outras classes de antimicrobianos (Chu et al., 2006).

2.4.8 Alteração das Proteínas Ligadoras de Penicilinas (PBPs)

As PBPs são enzimas que catalisam a síntese de peptidoglicano e também estão associados com a morfogênese celular e com o complexo de divisão celular (Sauvage et al., 2008). Estas enzimas são sítio alvo dos β -lactâmicos sendo que a afinidade entre eles é variada. Mutações podem resultar na alteração da estrutura das PBPs levando a uma baixa afinidade de ligação aos β -lactâmicos ou a produção de PBPs suplementares que também podem apresentar baixa afinidade. A consequência da mudança na conformação das PBPs é a resistência aos β -lactâmicos (Zapun et al., 2008).

Contudo, poucos estudos têm pesquisado alterações na afinidade ou na expressão de PBPs em *A. baumannii*. Já se observou que na presença de imipenem, há uma reorganização das PBPs que leva a resistência aos carbapenêmicos *in vitro* (Gehrlein et al., 1991). Mutantes de *A. calcoaceticus* resistentes à cefoxitina, à cefoperazona ou à ceftazidima, mostraram expressão reduzida de porinas e alterações na expressão das PBPs (Obara & Nakae, 1991). Em outro estudo, isolados de *A. baumannii* resistentes a antimicrobianos apresentaram expressão reduzida de uma PBP de 72kDa, em associação com a produção de carbapenemases (CHDLs) e em alguns isolados, com a perda de uma porina de 22,5 kDa (Fernández-Cuenca et al., 2003).

Yun e colaboradores (2011) observaram que quando cultivado um isolado de *A. baumannii* resistente ao imipenem em um meio com este antimicrobiano, houve um aumento da transcrição dos genes codificadores de PBPs *ponA* (PBP1a), *ftsI* (PBP3) e *dacC* (PBP5/6), dos sistemas de efluxo AdeABC e AdeJIK, e da β -lactamase cromossomal AmpC. Também se observou a repressão dos genes codificadores das proteínas de membrana externa OmpHMP (OmpA-like) e OmpW.

No trabalho de Cayô et al. (2011), que analisou variações alélicas em genes PBPs em isolados de *A. baumannii* com diferentes perfis de susceptibilidade aos carbapenêmicos, identificou sete genes PBPs, (PBP1a (*ponA*), PBP1b (*mrcB*), PBP2 (*pbpA/mrdA*), PBP3 (*ftsI*), PBP5/6 (*dacC*), PBP6b (*dacD*), PBP7/8 (*pbpG*)) e um gene transglicosilase monofuncional, MtgA (*mtgA*). Algumas mutações em regiões pontuais foram observadas, mas consideradas mutações silenciosas, não sendo associadas à resistência aos

carbapenêmicos, já que foram encontradas tanto nas cepas susceptíveis quanto nas resistentes a estes antimicrobianos.

2.4.9 Perda ou diminuição da expressão das proteínas de membrana externa (OMPs)

Diferentemente das bactérias Gram-positivas, as Gram-negativas possuem uma camada adicional na estrutura de sua parede celular, chamada de membrana externa (Nikaido, 1994). Esta membrana realiza papel crucial no fornecimento de uma camada extra de proteção sem comprometer as trocas de moléculas necessárias a esses microrganismos. Por possuir uma bicamada lipídica altamente hidrofóbica com canais protéicos transportadores, denominados proteínas de membrana externa (OMPs), a membrana externa age como uma barreira seletiva e também como primeira linha de defesa contra compostos tóxicos. Portanto as OMPs controlam o ingresso de substâncias nas bactérias (Nikaido, 1994; Vila et al., 2007; Delcour, 2009; Neves et al., 2011).

Um grupo específico de OMPs, as porinas, constitui para muitos antimicrobianos, o principal meio para atravessar a membrana bacteriana. Estas proteínas formam canais compostos por água no seu interior, que permitem a difusão passiva de solutos hidrofílicos pela membrana externa (Nikaido, 1992; Nikaido, 1994; Nitzan et al., 2002). As porinas são triméricas, formando poros na membrana externa, diferentemente das demais OMPs que são monoméricas e não formam poros (Nikaido, 1994).

A maioria das OMPs se configura em uma estrutura β -barril (Figura 2). O número e a configuração das cadeias- β permitem a formação de um poro hidrofílico central. O poro é um pouco constricto pela alça L3 extracelular enovelada interiormente. Esta alça juntamente com a parede oposta do barril, forma o chamado orifício ou zona de constrição, que determina o tamanho limite de exclusão e outras propriedades de permeabilidade. Resíduos de carga negativa são encontrados na alça L3 e resíduos de carga positiva formam um aglomerado na parede oposta do barril. As cadeias- β são conectadas por pequenas voltas no lado periplasmático e longas alças no lado extracelular sendo que este domínio extracelular que fornece o sítio de interações e difusão de compostos (Delcour, 2009).

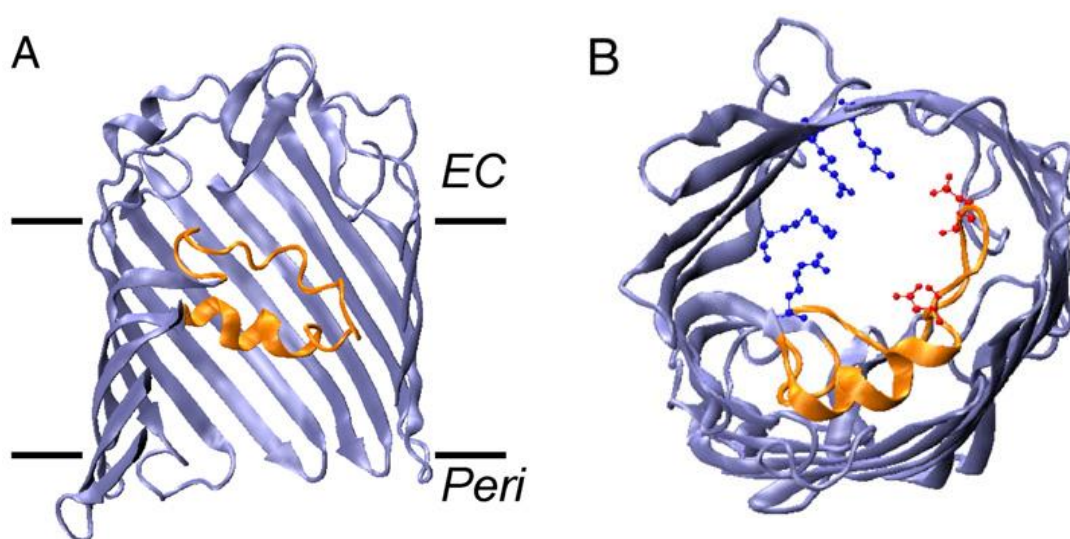


FIGURA 2: Estrutura de um monômero de OmpF. (A) Vista lateral de um único β -barril do trímero de OmpF para destacar a localização da proteína na bicamada da membrana celular. EC refere-se ao lado extracelular e Peri refere-se ao periplasma. A estrutura da proteína foi cortada na lateral para melhor visualização da alça L3 (em laranja). (B) Visualização do monômero de OmpF do lado periplasmático, destacando a configuração do orifício ou zona de constrição. Resíduos importantes são os resíduos ácidos de carga negativa da alça L3 (em vermelho) e um aglomerado de aminoácidos básicos de carga positiva da parede oposta do barril (em azul). Figura de Delcour (2009).

Moléculas de alto peso molecular e moléculas carregadas negativamente apresentam dificuldade em atravessar as porinas. Já moléculas pequenas, zwitteriônicas ou com características hidrofílicas, como cefepime e o imipenem, atravessam de forma rápida estas proteínas (Nikaido, 1994). Sabe-se que os antimicrobianos interagem com as cargas dos poros das porinas, e que a natureza e a posição de cargas específicas na molécula do antimicrobiano e na porina desempenham papel importante nessas interações (Tran et al., 2010).

A permeabilidade de porinas aos β -lactâmicos tem sido demonstrada por diferentes métodos que evidenciam o papel direto das porinas em mediar a difusão de β -lactâmicos pela membrana externa. Porém qualquer decréscimo na habilidade ou na taxa de entrada desses antimicrobianos na bactéria pode resultar em resistência aos mesmos (Delcour, 2009).

Há dois mecanismos principais de resistência aos antimicrobianos relacionados às porinas, já reportados em isolados clínicos. O primeiro refere-se a alterações nos perfis da membrana externa pela perda ou redução da expressão de porinas ou pela substituição de uma ou duas porinas maiores por outras; e o segundo mecanismo refere-se a alterações funcionais devido mutações específicas nos genes que codificam as porinas resultando na diminuição de permeabilidade (Peleg et al., 2008; Delcour, 2009).

A diminuição da expressão de porinas junto com a hiperexpressão de bombas de efluxo da família RND, está relacionada à resistência antimicrobiana em bactérias Gram negativas patogênicas (Fernando et al., 2013). O sistema de efluxo da família RND tem sua expressão controlada por

ativadores do sistema transcricional como MarA, codificado pelo operon de múltipla resistência a antibióticos *marRAB* e homólogos como SoxS e Rob. MarA também está envolvido no controle da expressão de porinas (diminuindo-a), através da ativação de *micF*, um pequena RNA anti-senso que se liga com o mRNA de *ompF* gerando um RNA duplex que altera a tradução e a estabilidade do mRNA, além de ativar a expressão de OmpX, que é uma porina reguladora da baixa expressão de porinas (Viveiros et al., 2007).

Em uma cepa de *E. coli* com resistência induzida à tetraciclina, o nível de OmpX foi elevado, sendo proposto que esta proteína prejudicaria a formação normal das porinas com OMPs chaperonas (necessárias para a inserção de proteínas enoveladas estavelmente na membrana externa e subsequente construção da forma trimérica) (Ruiz et al., 2006; Viveiros et al., 2007). Os monômeros de porinas enovelados de forma instável são então degradados por Deg proteases (serina-proteases), que fazem a proteólise de proteínas enoveladas erroneamente e proteínas danificadas, evitando o acúmulo tóxico de proteínas abortivas de membrana. Neste mesmo estudo a atividade das proteases estava aumentada duas a quatro vezes depois que *E. coli* tornou-se resistente a 10 mg/mL de tetraciclina, ao mesmo tempo que foi observada uma redução nas porinas devido a degradação de formas enoveladas erroneamente de OmpC e OmpF (Viveiros et al., 2007).

A substituição de uma proteína menor no lugar de proteínas maiores expressas constitutivamente é outra estratégia de resistência antimicrobiana (Domenech-Sanchez et al., 1999). Ainda, alterações funcionais que levam a diminuição da taxa de permeabilidade também são documentadas, como por

exemplo, mutações pontuais ou múltiplas na alça L3, podendo resultar numa distorção da alça ou o estreitamento do poro (Simonet et al., 2000; De et al., 2001). Foi reportado que isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* com múltiplas mutações no gene de uma porina (Omp36) apresentaram elevada resistência a cefepime, cefpiroma e imipenem (De et al., 2001). A resistência aos carbapenêmicos também foi relatada em mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* com deleções na alça L2 da OMP OprD.

Há vários estudos que relacionam a resistência a antimicrobianos com a perda ou mudanças funcionais de porinas em bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae* (Delcour, 2009). A resistência em específico aos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, devido modificações nas OMPs também tem sido descrita (Peleg et al., 2008).

Porém sabe-se muito pouco sobre as OMPs de *A. baumannii* (Vila et al., 2007; Peleg et al., 2008). Acredita-se que o pequeno número e tamanho das porinas encontradas em *A. baumannii* estão associados à sua resistência intrínseca a antimicrobianos. Comparando a membrana externa de *A. baumannii* com a de membros da família Enterobacteriaceae, esta é relativamente impermeável (Bratu et al., 2008). Sendo 5% menos permeável que a de outras bactérias Gram-negativas (Vila et al., 2007). No estudo de Sugawara & Nikaido (2012), foi observado que a permeabilidade da membrana externa de *A. baumannii* para cefalotina e cefaloridina foi 100 vezes menor que a permeabilidade em *E. coli* K12, concluindo que naturalmente *A. baumannii* apresenta baixa permeabilidade de membrana externa.

Apesar de até o momento terem sido identificadas poucas OMPs em *A. baumannii*, alguns trabalhos já relataram associação da diminuição da expressão de certas porinas com resistência aos carbapenêmicos neste microrganismo (Vila et al., 2007).

A perda de uma proteína de 29-kDa, conhecida como CarO, mostrou estar associada com a resistência ao imipenem e meropenem em isolados de *A. baumannii* (Peleg et al., 2008). Através de uma comparação proteômica de isolados sensíveis e resistentes de *A. baumannii*, observou-se alterações estruturais na proteína CarO principalmente nas suas estruturas primárias e quaternárias (Siroy et al., 2006; Vashist et al., 2010). Também foi observado que isoformas alteradas da proteína não transportavam eficientemente os carbapenens (Vashist et al., 2010). O estudo de Lee et al. (2011), igualmente verificou que a perda da OMP CarO desempenha papel na resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*. Contudo, neste mesmo estudo foi observado que um isolado com o gene para CarO intacto, exibiu níveis de CIM similares para imipenem e meropenem em comparação aos outros doze isolados clones sem a proteína. Sugerindo que sobre condições similares, a perda da OMP CarO teve um efeito mínimo na resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*.

Uma proteína de 33-36 kDa também foi descrita estar relacionada a resistência aos carbapenêmicos em um isolado de *A. baumannii* (Tomás et al., 2005). Porém no estudo de Siroy et al., (2006) em que foi realizada a comparação proteômica entre isolados multirresistentes de *A. baumannii* e uma

cepa referência, nenhuma diferença foi observada na expressão desta proteína.

Outra proteína de 43 kDa descrita como homóloga a OprD de *P. aeruginosa*, da mesma forma foi relacionada a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* (Dupont et al., 2005). Ao contrário, nos estudos de Smani & Pachón (2013) e de Catel-Ferreira et al., (2012), foi demonstrado que a proteína homóloga a OprD não está envolvida na difusão específica de antimicrobianos e conseqüentemente não contribui para a resistência aos carbapenêmicos nesta espécie. Ainda o estudo de Catel-Ferreira et al. (2012) constatou que OprD tem funções e sequência mais similares a de OprQ de *Pseudomonas* sp., que oferece sítios específicos para a ligação de íons de ferro e magnésio permitindo *A. baumannii* a se adaptar a condições de stress. Desta forma os autores sugerem nova denominação da proteína homóloga a OprD para proteína tipo OprQ (OprQ-like protein).

OmpW de 21 kDa, homóloga a OmpW de *E. coli* e *P. aeruginosa*, foi descrita estar envolvida na resistência aos carbapenêmicos pela avaliação proteômica de isolados de *A. baumannii* resistentes a estes antimicrobianos em que se observou diminuição da expressão de OmpW em comparação a cepa padrão ATCC 19606 de *A. baumannii* sensível aos carbapenêmicos (Tiwari et al., 2012). No estudo similar de Siroy et al. (2006), não se observou alteração na expressão de OmpW, porém relatou quatro isoformas diferentes dessa OMP no gel de dodecil-sulfato de sódio em poliacrilamida (SDS-PAGE). Em outro trabalho também foi verificada a presença de isoformas de OmpW e nele foi proposto que esta porina pequena possivelmente fosse importante para realizar

funções de transporte na ausência de outras porinas principais em isolados resistentes de *A. baumannii* (Vashist et al., 2010).

HMP-AB é a maior e mais estudada OMP em *A. baumannii*. É análoga a OmpA de *E. coli* e OprF de *P. aeruginosa*. HMP-AB é uma proteína modificada pelo calor, mostrando diferente mobilidade em SDS-PAGE sem aquecimento e depois de 10 minutos a 95°C. O gene de HMP-AB codifica uma proteína de 346 aminoácidos com uma massa molecular de 35.636 Da. Ela está agregada na membrana na forma monomérica (Siroy et al., 2005; Vila et al., 2007).

HMP-AB pertence à família de OmpA, constituída de proteínas ditas como lentas, que permitem a penetração de β -lactâmicos e sacarídeos de até 800 Da, mas com uma eficiência muito menor que a principal porina OmpF de *E. coli*. Apresenta menor difusão a solutos pequenos, porém permite a difusão de solutos muito maiores, que não conseguem penetrar através do canal da OmpF de *E. coli* (Siroy et al., 2005; Vila et al., 2007). Esta combinação de um canal de tamanho grande e uma taxa de permeabilidade lenta, que parece ser contraditória, é comum entre a família de OmpA e é devido ao fato que somente uma minoria dessas moléculas proteicas dobra-se em uma conformação em que o canal fica aberto (Sugawara & Nikaido, 2012). Em organismos que faltam porinas triméricas, proteínas da família OmpA funcionam como as principais porinas e podem contribuir para níveis elevados de resistência intrínseca (Siroy et al., 2005; Vila et al., 2007).

Sugawara & Nikaido (2012) demonstraram que quando deletado o gene *ompA*, há uma diminuição de 2 a 3 vezes na permeabilidade para

cefalotina e cefaloridina. Já no estudo de Bratu et al., (2008) não foi observada associação entre resistência antimicrobiana e alterações na expressão ou mudanças fenotípicas em OmpA.

Percebe-se que são necessários estudos adicionais quanto à expressão e caracterização fenotípica das OMPs em *A. baumannii* que ajudarão a esclarecer o papel da permeabilidade da membrana externa na resistência aos β -lactâmicos (Gribun et al., 2003; Bratu et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular 166 do departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1 Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções utilizados nos experimentos deste trabalho estão descritos nos anexos.

3.2 Isolados bacterianos

Foram utilizados um total de 19 isolados de *Acinetobacter* sp., sendo 16 isolados de origem clínica, obtidos junto aos laboratórios de análises clínicas de quatro hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil, nos períodos de julho de 2006 a setembro de 2007 e 3 isolados coletados do efluente hospitalar de dois destes hospitais no mesmo período (Ferreira, 2010).

Em estudo prévio foi realizada a identificação dos isolados como pertencentes ao gênero *Acinetobacter* sp. através da amplificação do gene 16S rRNA pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os isolados também tiveram seu perfil de susceptibilidade testado frente aos

antimicrobianos amicacina (AMI), ampicilina (AMP), aztreonam (ATM), cefepime (CPM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GEN), imipenem (IMP), meropenem (MER), piperacilina-tazobactam (PPT), sulfametoxazol-trimetoprim (SUT) e ticarcilina-ácido clavulânico (TIC) utilizando a técnica de disco difusão em Ágar Mueller Hinton (Ferreira, 2010). Foi verificada também a presença dos genes codificadores Metalo- β -lactamases (*vim*, *imp* e *spm*) de β -lactamases (*bla*-OXA-23, *bla*-OXA-24, *bla*-OXA-51, *bla*-OXA-58) e da sequência de inserção IS*Aba*1 por PCR (Ferreira, 2010; Gusatti, 2011). Em outros estudos também foi verificada a presença de bombas de efluxo nos isolados através da detecção dos genes do sistema AdeABC (*adeA*, *adeB*, *adeC*, *adeR* e *adeS*) através de PCR (Marchetti, 2010; Hain, 2013).

No presente trabalho foram então selecionados isolados multirresistentes, ou seja, que apresentaram resistência a mais de uma classe de antimicrobianos e dentre eles cepas positivas e negativas para os genes estudados (Tabela 2).

3.3 Recuperação dos isolados

Os isolados encontravam-se estocados em caldo BHI com 15% de glicerol e mantidos em freezer a -20°C. Para recuperá-los foram cultivados em 2mL de caldo BHI, incubados a 37°C por 24 horas. Para verificar a pureza das culturas, foi realizado o isolamento em placas contendo ágar TSA e posterior coloração de Gram. Um novo estoque dos isolados foi feito em caldo BHI com 15% de glicerol e armazenados a -20°C.

TABELA 2: Isolados de *Acinetobacter* sp. selecionados para este estudo e o perfil de resistência a antimicrobianos.

Isolados	Perfil de resistência
IC 23	AMI-AMP-CPM-CAZ-GEN-IMP-MER-PPT-TIC
IC 32	AMP-CPM-CAZ-GEN-IMP-MER-PPT-TIC
IC 53	AMI-AMP-CPM-GEN-IMP-MER-PPT
IC 70	AMI-AMP-CPM-GEN-IMP-MER-PPT
IC 133	AMP-CPM-CAZ-GEN-IMP-MER-PPT
IC 147	AMI-AMP-CPM-GEN-IMP-MER-PPT
IC 186	AMI-AMP-CPM-CAZ-GEN-IMP-MER-PPT
IC 188	AMI-AMP-CPM-GEN-IMP-MER-PPT
IC 220	AMI-AMP-CPM-GEN-IMP-MER-PPT
IC 269	AMI-CPM-CAZ-PPT
IC 283	AMI-CPM-CAZ-GEN-IMP-MER-PPT
IC 289	AMI-AMP-CPM-GEN-IMP-MER-PPT
IC 294	AMI-AMP-CPM-GEN-IMP-MER-PPT
IC 299	AMI-AMP-CPM-GEN-IMP-MER-PPT
IC 301	AMI-AMP-CPM-GEN-IMP-MER-PPT
IC 302	AMI-AMP-CPM-GEN-IMP-MER-PPT
O6	AMI-ATM-CAZ-CPM-CIP-GEN-IMP-MER-PPT -TIC
O17	AMI-ATM-CAZ-CPM-CIP-GEN-IMP-MER-PPT -TIC
G47h	AMI-ATM-CAZ-CPM-CIP-GEN-MER-PPT -TIC

AMI: amicacina, AMP: ampicilina, ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, CPM: cefepime, GEN: gentamicina, IMP: imipenem, MER: meropenem, PPT: piperacilina-tazobactam, SUT: sulfametoxazol-trimetoprim e TIC: ticarcilina-ácido clavulânico.

3.4 Identificação das espécies de *Acinetobacter*

3.4.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada conforme descrito por Misbah et al. (2005), com modificações. Os isolados foram cultivados em placas contendo TSA a 37°C por 24 horas. Após a incubação, foram selecionadas de duas a três colônias que foram suspendidas em 100µL de água MiliQ e fervidas por 10 minutos. Após a fervura os isolados foram centrifugados a 12000 g por 10

minutos, o sobrenadante resultante contendo o DNA bacteriano foi separado e armazenado a -20°C para posterior utilização.

3.4.2 Amplificação dos genes 16S rRNA e *rpoB* dos isolados

Para a identificação das espécies de *Acinetobacter* foi realizada a amplificação de um fragmento dos genes 16S rRNA e *rpoB* através de PCR. O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do fragmento de cerca de 1200 pb do gene 16S rRNA foi Acin16S F (5' CCT TGC GYT AAT AGA TGA GC 3') e Acin16S R (5' GTA GCA ACC CTT TGT ACC GA 3'), específicos para o gênero *Acinetobacter* (Ferreira, 2010). As reações de amplificação foram realizadas em misturas contendo 3,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 1µM de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA- polimerase, 1x de tampão de reação da Taq DNA-polimerase e 2 µL de DNA bacteriano em um volume final de reação de 25 µL. Foi utilizado o aparelho termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) nas seguintes condições de amplificação: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo final de extensão de 72°C por 8 minutos.

O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação da zona 1 (350pb) do gene *rpoB* foi AcrpoB 696F (5' TAY CGY AAA GAY TTG AAA GAA G 3') e AcrpoB 1093R (5' CMA CAC CYT TGT TMC CRT GA 3'), também específicos para o gênero *Acinetobacter* (La Scola et al., 2006). As reações de amplificação foram realizadas em misturas contendo 3,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTP's, 1µM de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA-

polimerase, 1x de tampão de reação da Taq DNA-polimerase e 2 µL de DNA bacteriano em um volume final de reação de 25 µL. Foi utilizado o aparelho termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) nas seguintes condições de amplificação: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo final de extensão de 72°C por 12 minutos.

Em todas as reações de PCR foram incluídos o controle positivo contendo a cepa padrão *A. baumannii* ATCC 19606, o controle negativo com DNA de *Escherichia coli* ATCC 25922 e o branco na ausência de DNA como controle de contaminação. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e corado por solução de brometo de etídio, a uma corrente elétrica de 100v por 1 hora em tampão TAE 1x. O gel foi então visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografado com câmera digital Kodak 1D. Os amplicons foram purificados utilizando o kit de purificação (Innsorb Fragment Clean Up 250) e 45 a 50 ng de DNA submetidos ao seqüenciamento automatizado (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer). A pesquisa da homologia da seqüência nucleotídica foi realizada utilizando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST - GenBank), na qual as seqüências foram alinhadas e comparadas com seqüências já publicadas de diferentes espécies de *Acinetobacter*.

Com base nos resultados obtidos após comparação das seqüências obtidas com seqüências de referência no BLAST, foram produzidas árvores

filogenéticas com o auxílio do programa MEGA utilizando o algoritmo Neighbor-Joining (NJ).

3.5 Concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos antimicrobianos imipenem (IMP) e ceftazidima (CAZ) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo o CLSI (2012), com substituição do caldo Mueller Hinton pelo caldo BHI devido à incapacidade da maioria dos isolados em estudo de crescerem em caldo Mueller Hinton. Outros trabalhos também relatam substituição do meio de cultura Mueller Hinton por outros meios para testes de determinação da CIM (Duncan, 1974; Viveiros et al., 2007; Sugawara & Nikaido, 2012).

A partir da solução estoque foi realizada a diluição seriada do antimicrobiano nas concentrações de 512 a 1 µg/mL. Para o preparo do inóculo, inicialmente os isolados foram semeados em placas contendo TSA e mantidos em estufa a 37°C durante 24 horas. As colônias isoladas foram suspensas em solução salina a 0,9% com ajuste à turvação 0,5 da escala de MacFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL). Essa suspensão foi diluída novamente em solução salina a 0,9% em uma proporção de 1:10 (10^7 UFC/mL). Em microplaca de 96 poços, 100 µL das diluições do antimicrobiano foram pipetados em cada poço e 5 µL do inóculo, obtendo-se uma concentração final de bactérias de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Em todos os testes foram realizados o controle negativo, onde foram pipetados 100 µL do caldo sem antimicrobiano e sem inóculo para observação da esterilidade do meio de cultura, o controle

positivo, com o caldo sem antimicrobiano no qual o inóculo foi semeado e assim pode-se observar o crescimento bacteriano e controle das diluições do antimicrobiano nos quais a cepa padrão de *A. baumannii* ATCC 19606 sensível foi semeada. A CIM foi determinada como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano. Os pontos de corte para IMP e CAZ estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3: Pontos de corte para os antimicrobianos IMP e CAZ segundo CLSI (2012).

Antimicrobiano	S	I	R
Imipenem (IMP)	≤4 µg/mL	8 µg/mL	≥ 16 µg/mL
Ceftazidima (CAZ)	≤ 8 µg/mL	16 µg/mL	≥ 32 µg/mL

S: sensível, I: intermediário, R: resistente.

3.6 Análise fenotípica de sistema de efluxo dependente de força próton motiva

A determinação do sistema de efluxo dependente da força próton motiva baseou-se em Moreira et al. (2005). Para detecção do sistema de efluxo AdeABC, foi utilizado um desacoplador da força próton motiva, carbonil-cianeto-m-clorofenilidrazona (CCCP), que diminui a energia disponível ao transporte. A concentração de CCCP escolhida para o uso foi 30mM, que corresponde a maior concentração que não inibiu o crescimento microbiano. O teste foi realizado pelo método de microdiluição em caldo BHI. Cada poço da microplaca continha 5×10^5 UFC/mL do inóculo bacteriano, 30 mM de CCCP e 100 µL de caldo BHI com antimicrobiano nas concentrações 512 a 1µg/mL. A

presença de fenótipo de efluxo foi determinado pela comparação dos valores de CIM na presença e ausência do CCCP. A redução da CIM de no mínimo duas vezes, em presença do desacoplador, indica resultado positivo para bombas de efluxo (Moreira et al., 2005; Opazo et al., 2009).

3.7 Análise fenotípica do perfil de OMPs

A análise das OMPs foi realizada nos isolados e seus revertentes crescidos na ausência e presença dos antimicrobianos IMP e CAZ para verificar possível alteração no perfil das OMPs diante destas condições.

Para a extração das OMPs nos isolados, estes foram cultivados em caldo BHI contendo 16 µg/mL de IMP e 32 µg/mL de CAZ em tubos diferentes mantidos a 37°C por 24 horas. A partir do caldo BHI uma alíquota foi semeada em placas contendo TSA com as mesmas concentrações dos antimicrobianos para o isolamento. Deste crescimento determinou-se a CIM aos antimicrobianos IMP e CAZ e a primeira extração das OMPs foi realizada conforme a metodologia descrita no tópico 3.7.2.

3.7.1 Obtenção dos revertentes dos isolados

Os isolados foram cultivados em placas contendo TSA na ausência de antimicrobianos com o objetivo de torná-los sensíveis ao IMP e CAZ. Realizou-se 25 cultivos em TSA e a cada 2 semeaduras a CIM ao IMP e CAZ foi determinada. Estes clones foram denominados de revertentes 1 (rev1). Durante os cultivos, à medida que os rev1 se tornavam sensíveis ao IMP ou à CAZ a extração das OMPs já era realizada ou então após os 25 cultivos,

mesmo nos rev1 que não se tornaram sensíveis aos antimicrobianos (Figura 3, A).

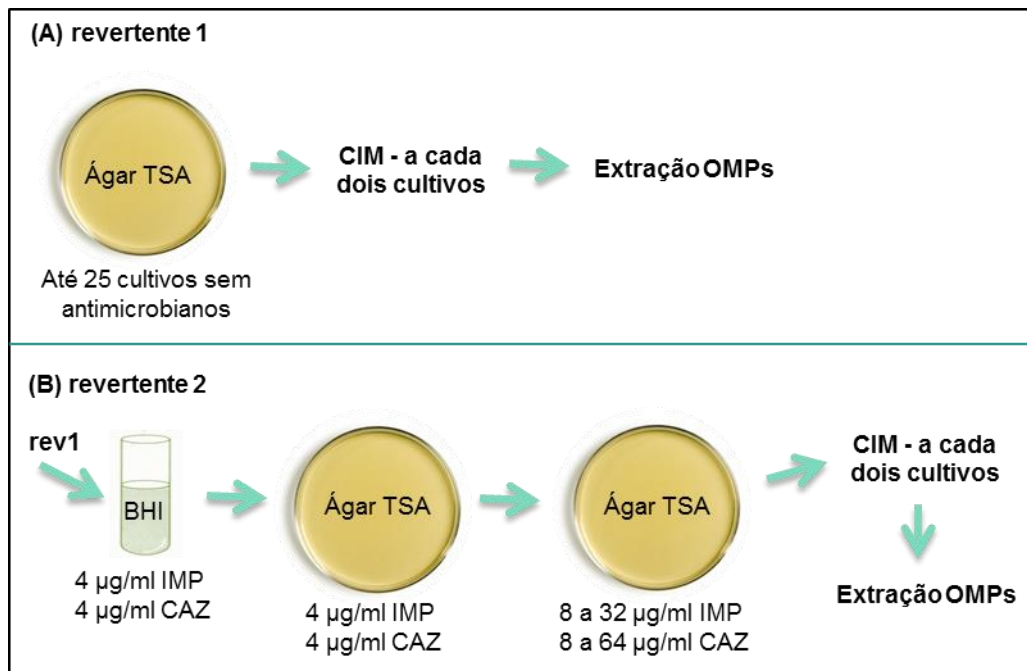


FIGURA 3: Esquema de obtenção dos revertentes dos isolados. TSA: ágar triptona de soja; BHI: caldo infusão cérebro coração; CIM: concentração inibitória mínima; OMPs: proteínas de membrana externa; IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima. (A) Obtenção do revertente 1. Os isolados foram submetidos a 25 cultivos em TSA sem antimicrobianos a fim de torná-los sensíveis ao IMP e CAZ. A cada 2 cultivos a CIM ao IMP e CAZ foi determinada. Em seguida as OMPs foram extraídas. (B) Obtenção do revertente 2. rev1 foi cultivado em tubos separados com caldo BHI, um contendo 4 µg/mL de IMP e o outro 4 µg/mL de CAZ. A partir do caldo BHI com IMP uma alíquota foi semeada em TSA com 4 µg/mL de IMP e do caldo BHI com CAZ uma alíquota foi semeada em TSA com 4 µg/mL de CAZ. Em seguida foram realizadas sementeiras sucessivas em TSA com concentrações de 8 a 32 µg/mL de IMP e 8 a 64 µg/mL de CAZ separadamente, com o objetivo de induzir a resistência a estes antimicrobianos nos isolados. A cada 2 cultivos a CIM ao IMP e CAZ foi determinada. Após os cultivos as OMPs foram extraídas.

Após a cultura em TSA sem antimicrobianos, os rev1 foram cultivados em dois tubos com caldo BHI, um com 4 µg/mL de IMP e o outro com 4 µg/mL de CAZ. Do caldo BHI com IMP uma alíquota foi semeada em placa contendo TSA com 4 µg/mL de IMP e do caldo BHI com CAZ uma

alíquota foi semeada em placa contendo TSA com 4 µg/mL de CAZ. A partir destas culturas foram realizadas semeaduras sucessivas em TSA com concentrações de 8 a 32 µg/mL de IMP e 8 a 64 µg/mL de CAZ com o objetivo de induzir a resistência a estes antimicrobianos, obtendo-se desta forma os revertentes 2 (rev2). Depois dos cultivos na presença de IMP e CAZ, a CIM foi determinada e realizada a extração das OMPs dos rev2 (Figura 3, B).

3.7.2 Extração de proteínas de membrana externa

A extração de proteínas de membrana externa foi realizada seguindo a metodologia de Laemmli (1970), com padronização. As células bacterianas foram inicialmente cultivadas em 120 mL de caldo BHI, constituindo o pré-inóculo. Após incubação a 37°C por 24 horas o préinóculo foi adicionado a 300 mL de caldo BHI até que atingisse uma turbidez de 1 da escala de Mac Farland para a cultura na ausência de antimicrobiano e turbidez de 2 para a cultura com antimicrobiano. O inóculo foi incubado a 37°C por 24 horas, obtendo-se desta forma uma turbidez final maior que 2 da escala de Mac Farland (cerca de 6×10^8 UFC/mL). A turbidez foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600nm.

As células foram então centrifugadas a 2.300 g por 15 minutos. O sedimento obtido da centrifugação foi suspenso em 1,5 mL de tampão fosfato de sódio (PBS), 10 mM/pH 7,0, acrescido do inibidor de protease fluoreto fenil-metil-sulfonila (PMSF) na concentração de 1mM e as células foram rompidas com o auxílio de sonicador, utilizando-se três pulsos, um minuto cada um e intervalo para resfriamento em banho de gelo para preservação das proteínas.

Os restos celulares foram removidos por centrifugação (1.800 g) e o sobrenadante resultante foi submetido à ultra-centrifugação (45.000 g), durante 60 minutos a 4°C para coleta das frações de membrana. O sedimento resultante foi suspenso em 150 µL de solução tampão fosfato de sódio (PBS) 10mM/ pH 7,0 acrescido de PMSF 1 mM; os 150 µL foram tratados com 800 µL de solução sarcosil a 2% por 20 minutos a temperatura ambiente. A membrana externa foi obtida após a última centrifugação de 16.000 g durante 60 minutos a 4°C. O pellet foi suspenso em 50 µL de tampão PBS 10mM/ pH 7,0 acrescido de PMFS 1mM e mantido sob refrigeração a 4°C durante 24 horas para solubilização. O produto da extração foi estocado a -20°C para posterior análise por eletroforese.

3.7.3 Análise das proteínas de membrana externa (OMPs)

Os extratos das OMPs foram analisados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Achtman et al., 1983; Fung-Tomc et al., 1995). Os extratos foram fervidos por 10 minutos com tampão de amostra (Tris-HCL 0,5M, SDS 10%, Glicerina 20% e azul de bromofenol 0,01%) previamente acrescido de 20 µL de beta-mercapto-etanol. As proteínas extraídas foram aplicadas nos géis de dodecil sulfato de sódio contendo: 15 % de acrilamida no gel de separação e 5% no gel de empilhamento em um volume de 20uL de amostra por poço. A corrida do gel foi realizada a 70 V durante 3 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado por 30 minutos com Coomassie Blue e descorado com solução de metanol e ácido acético a 10% (Laemmli, 1970). Os géis foram fotografados e o tamanho das bandas determinado com a ferramenta Gene Tools 4. As proteínas de interesse

foram identificadas por sequenciamento a partir do gel de poliacrilamida pelo método de espectrometria de massas ESI-Q-ToF (Equipamento MicroMass Q-ToF Micro acoplado a cromatógrafo líquido de ultraeficiência nanoAcquity UPLC – WATERS), na Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS) do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

A sequência de aminoácidos da proteína foi analisada pela ferramenta BLAST, na qual a sequência foi alinhada e comparada com sequências de proteínas já publicadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação das espécies de *Acinetobacter* sp.

Os 19 isolados de *Acinetobacter* sp. avaliados tiveram as sequências de um fragmento do gene 16S rRNA e da zona 1 de *rpoB* corretamente amplificadas pela PCR e comparadas com sequências de isolados e cepas referências de *Acinetobacter* sp. depositadas no GenBank.

Através da análise da sequência do fragmento do gene 16S rRNA, 17 isolados apresentaram 100% de similaridade com a espécie *A. baumannii*, 1 isolado (IC 269) foi relacionado com mais de uma espécie apresentando similaridade de 100% com as espécies *A. baumannii*, *A. soli*, *A. junii*, *A. venetianus* e *A. ursingii* e 1 isolado (IC 70) teve similaridade máxima de 96% com as espécies *A. baumannii*, *A. soli*, *A. beijerinckii*, *A. radioresistens*, *A. lwoffii*, *A. junii*, *A. venetianus* e *A. ursingii* (Tabela 4).

Portanto IC 70 e IC 269 não tiveram a espécie definida pelo gene 16S rRNA. Possivelmente porque a sequência destes dois isolados submetida à análise foi menor (IC 70 – 135 nucleotídeos e IC 269 – 210 nucleotídeos), pareando com regiões muito conservadas entre as espécies citadas, além de que a variabilidade limitada do gene 16S rRNA entre as espécies de *Acinetobacter* pode também ter contribuído para este resultado (La Scola et al., 2006).

TABELA 4: Resultado da análise das sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB*.

ISOLADO	Identificação pelo gene 16S rRNA		Identificação pelo gene <i>rpoB</i>	
	Primeira espécie mais próxima (% similaridade nucleotídica)	Segunda espécie mais próxima (% similaridade nucleotídica)	Primeira espécie mais próxima (% similaridade nucleotídica)	Segunda espécie mais próxima (% similaridade nucleotídica)
IC 23	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/ pittii</i> (97%)
IC 32	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/ calcoaceticus</i> (99%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/ pittii</i> (97%)
IC 53	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/ pittii</i> (97%)
IC 70	<i>A. baumannii/ soli/ junii/ beijerinckii/ radioresistens/ lwoffii/ venetianus/ ursingii</i> (96%)	<i>A. parvus</i> (95%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/ pittii</i> (97%)
IC 133	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. calcoaceticus</i> (99%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/ pittii</i> (97%)
IC 147	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/ calcoaceticus/ schindleri</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis</i> (97%)
IC 186	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/ calcoaceticus/ junii</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/ pittii</i> (97%)
IC 188	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/ calcoaceticus/ junii</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/ pittii/ calcoaceticus</i> (96%)
IC 220	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/ calcoaceticus/ junii</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/ pittii</i> (97%)
IC 269	<i>A. baumannii/ soli / junii/ venetianus/ ursingii</i> (100%)	<i>A. beijerinckii/ radioresistens/ lwoffii/ gernerii</i> (99%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/ pittii</i> (97%)
IC 283	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. calcoaceticus</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis</i> (97%)
IC 289	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/ calcoaceticus/ junii</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis</i> (97%)
IC 294	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/ calcoaceticus/ junii</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/ pittii</i> (97%)
IC 299	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/ calcoaceticus/ junii/ schindleri</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis</i> (97%)
IC 301	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/ pittii</i> (97%)
IC 302	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/ calcoaceticus/ junii/ schindleri</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis</i> (97%)
G47h	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/ calcoaceticus/ junii/ schindleri</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. nosocomialis/ pittii/ calcoaceticus</i> (96%)
O17	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus/ calcoaceticus/ junii/ schindleri</i> (98%)	<i>A. baumannii</i> (99%)	<i>A. nosocomialis</i> (97%)
O6	<i>A. baumannii</i> (100%)	<i>A. haemolyticus</i> (99%)	<i>A. baumannii</i> (99%)	<i>A. nosocomialis</i> (97%)

Três isolados (IC 32, IC 133 e O6) identificados com 100% de similaridade com *A. baumannii*, apresentaram segunda espécie mais próxima com 99% de similaridade com *A. haemolyticus* e/ou *A. calcoaceticus*, valor dentro do ponto de corte da faixa de similaridade que é de 98,7% a 99% para o gene 16S rRNA para que a espécie seja determinada (Tabela 4) (Stackebrandt & Evers, 2006). Considerando que o gene 16S rRNA não é polimórfico suficiente para distinguir espécies muito relacionadas de *Acinetobacter* (La Scola et al., 2006), encontrar uma segunda espécie com porcentagem de similaridade dentro do ponto de corte coloca em dúvida a identificação destes três isolados.

Em outro estudo já foi relatada a identificação errônea de isolados da espécie *A. baumannii* como sendo *A. calcoaceticus* pela comparação da sequência do gene 16S rRNA (La Scola & Raoult, 2004; La Scola et al., 2006). Verificando a importância de um método adicional de identificação para a precisa diferenciação das espécies de *Acinetobacter*.

Pela análise da sequência da zona 1 do gene *rpoB*, os 19 isolados foram corretamente identificados sendo que 17 apresentaram 100% de similaridade com a espécie *A. baumannii* e 2 isolados a similaridade foi de 99% com esta espécie. O gene *rpoB* demonstrou ser mais discriminatório que o gene 16S rRNA. IC 70 e IC 269 não identificados pelo gene 16S rRNA, com a sequência da zona 1 do gene *rpoB* foram identificados com 100% de similaridade com a espécie *A. baumannii*. IC 32, IC 133 e O6 também tiveram identificação precisa pelo gene *rpoB* como pertencentes a espécie *A. baumannii*, descartando a dúvida devido a segunda espécie mais próxima pelo

gene 16S rRNA ter tido similaridade elevada, dentro do ponto de corte (Tabela 4).

Pelo gene *rpoB* a segunda espécie mais próxima de todos isolados teve similaridade entre 96 a 97% com as espécies *A. nosocomialis* e/ou *A. pittii* e/ou *A. calcoaceticus*, abaixo do ponto de corte de 98 a 100% para identificação da espécie por este gene (Gundi et al., 2009), diferenciando de forma clara os isolados de *A. baumannii* das demais espécies (Tabela 4). Resultado que vai de acordo com outros trabalhos já reportados que verificaram que a zona 1 do gene *rpoB* é capaz de distinguir *A. baumannii* das outras espécies e do complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* (Gundi et al., 2009; Karah et al., 2011).

No estudo de Gundi et al. (2009) de validação da zona 1 do gene *rpoB* para a identificação de espécies de *Acinetobacter*, as espécies do complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* foram bem separadas com valores de similaridade interespecies entre 88.3 a 96.9%. Além disso, a similaridade intraespecies para as espécies do complexo foram de 98 a 100% para *A. baumannii*, 98 a 100% para *A. nosocomialis* (genoespécie 13TU), 98 a 100% para *A. pittii* (genoespécie 3) e 98,6 a 100% para *A. calcoaceticus*.

Foram construídas árvores filogenéticas com as sequências do fragmento do gene 16S rRNA e da zona 1 do gene *rpoB* dos isolados e cepas referências de *Acinetobacter* sp. usando o método neighbor-joining. Porém não foi encontrada congruência entre elas. A árvore filogenética com as sequências do gene 16S rRNA mostrou valores muito baixos de bootstraps nos agrupamentos, além de que no mesmo agrupamento ficaram os isolados

estudados com diferentes espécies de cepas padrão de *Acinetobacter*, não produzindo um resultado fidedigno (Figura 4), já a árvore construída com a sequência da zona 1 do gene *rpoB*, os 19 isolados estudados foram agrupados com *A. baumannii* com bootstrap de 60% (Figura 5).

O poder discriminatório do gene *rpoB* também foi evidenciado no trabalho de Karah et al. (2011), em que um isolado foi identificado com 98,9% de similaridade com *Acinetobacter* genoespécie 'próxima a 13TU' através da análise da zona 1 do gene *rpoB*, tendo como segunda espécie mais próxima *Acinetobacter* genoespécie 13TU com 95,5% de similaridade. Pela comparação da sequência do gene 16S rRNA este isolado apresentou similaridade de 99,4% com *Acinetobacter* genoespécie 'próxima a 13TU' e com *Acinetobacter* genoespécie 13TU. Analisando então a sequência parcial do gene *recA* se confirmou a identificação pelo gene *rpoB*.

Álvarez-Buylla et al. (2012) também mostrou que com a sequência do gene *rpoB* foi possível identificar facilmente todos isolados de *Acinetobacter* sp estudados. De 31 isolados analisados tanto pelo sequenciamento do gene *rpoB* quanto pelo MALDI-TOF MS, 15 (48,4%) foram erroneamente identificados a nível de espécie pelo MALDI-TOF MS. Este erro foi atribuído ao banco de dados do método, que não é extensivo o suficiente. Concluindo que esta técnica de espectrometria não é segura quando uma identificação precisa das espécies de *Acinetobacter* é necessária e que a identificação pelo sequenciamento do gene *rpoB* é um método prático e preciso.

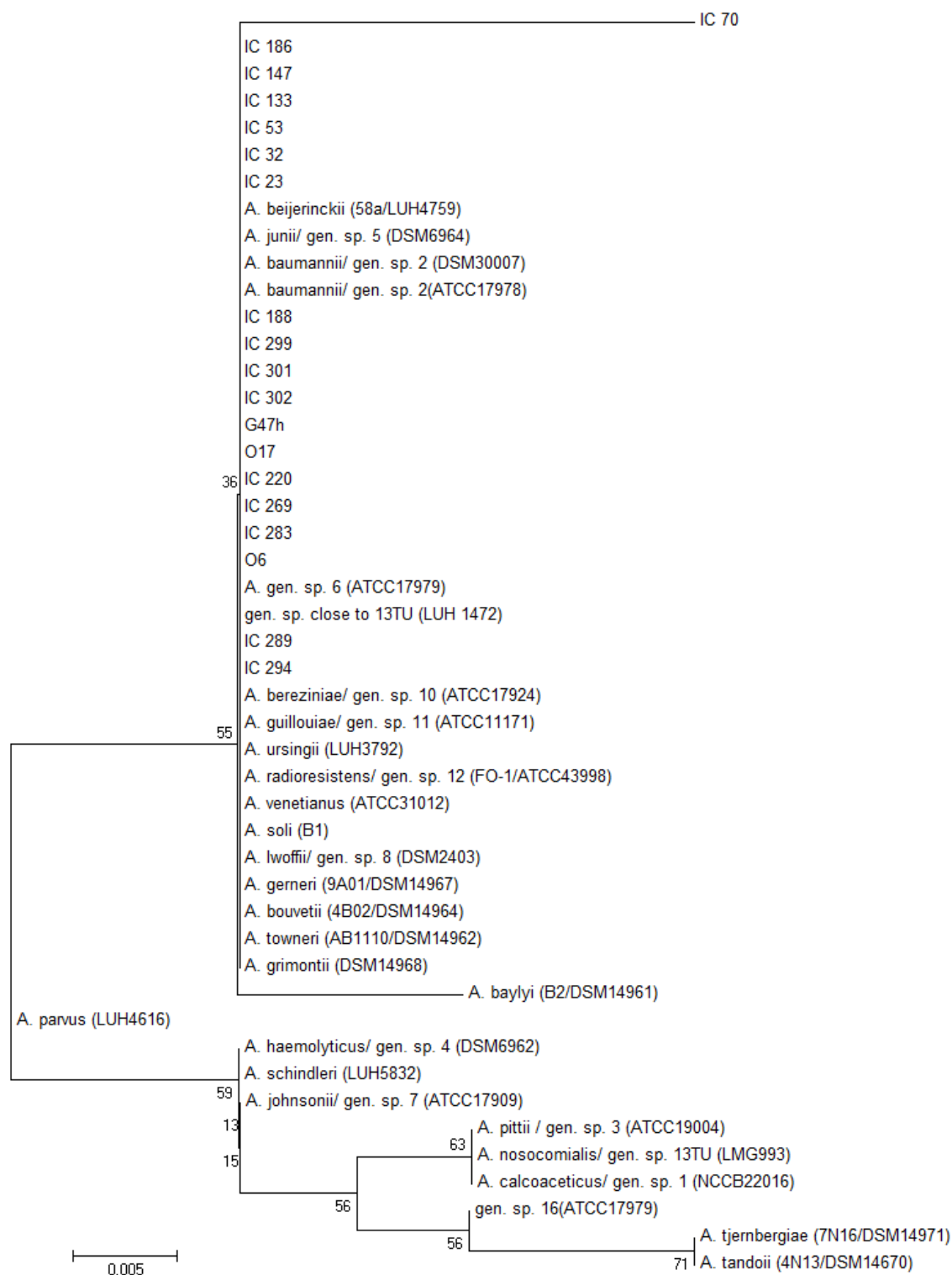


Figura 4: Dendrograma representando relações filogenéticas de espécies de *Acinetobacter* usando o método neighbor-joining. A árvore foi derivada do alinhamento de seqüências de um fragmento do gene 16S rRNA. O suporte de cada ramo foi determinado por 1000 replicatas. O bootstrap de cada ramo está indicado pelo valor em cada nó (em porcentagem). 0,005 representa o número de substituições por sítio.

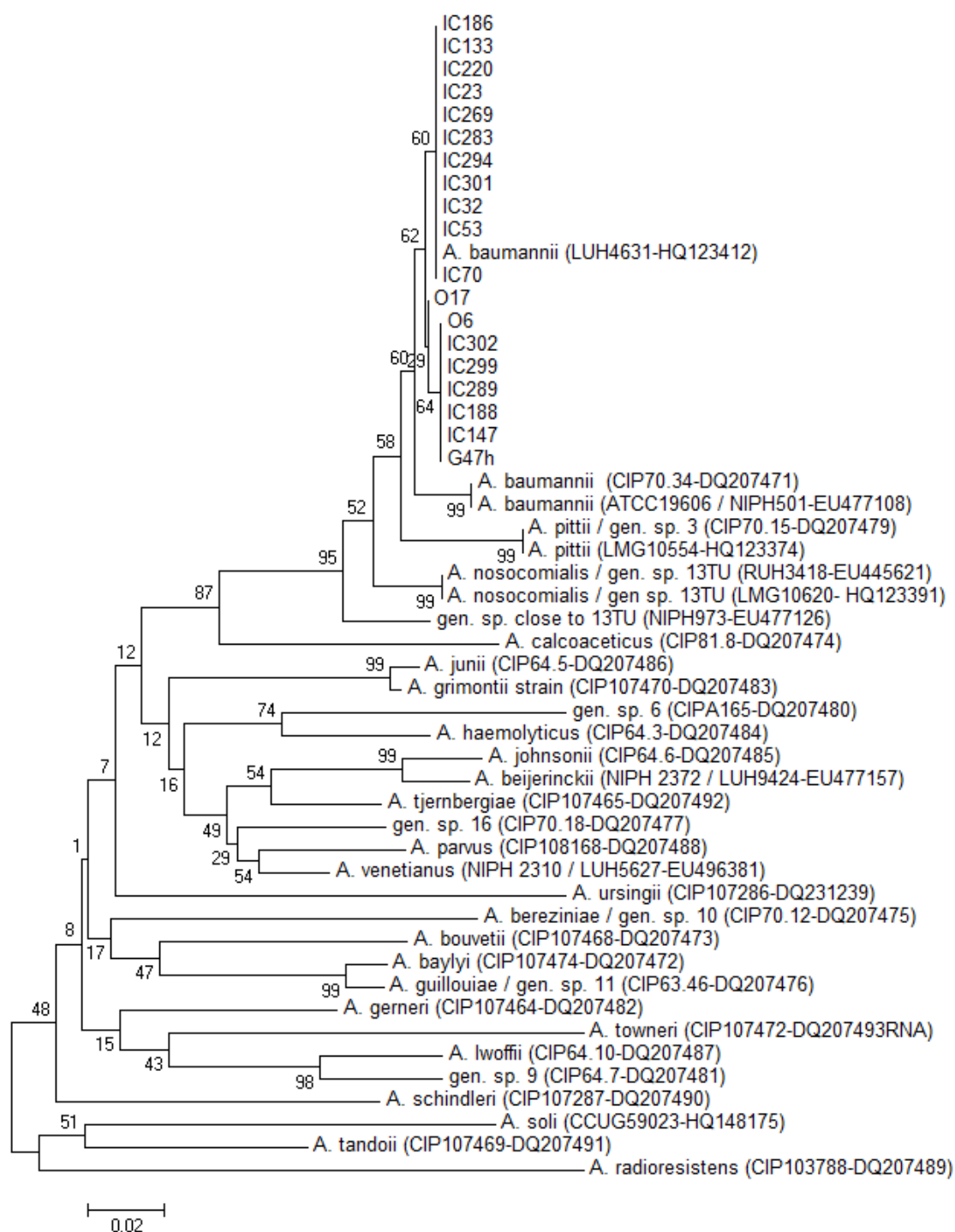


Figura 5: Dendrograma representando relações filogenéticas de espécies de *Acinetobacter* usando o método neighbor-joining. A árvore foi derivada do alinhamento de sequências da zona 1 do gene *rpoB*. O suporte de cada ramo foi determinado por 1000 replicatas. O bootstrap de cada ramo está indicado pelo valor em cada nó (em porcentagem). 0,02 representa o número de substituições por sítio.

Estudos reforçam a ideia de que outras espécies de *Acinetobacter* além de *A. baumannii*, podem ser mais significativas como patógenos humanos do que se originalmente pensava (Álvarez-Buylla et al., 2012). Trabalhos anteriores têm destacado a relevância clínica destes microrganismos em diversas doenças (Dortet et al., 2006; Molina et al., 2010).

Além de infecções nosocomiais, é sugerido que espécies de *Acinetobacter* também causem infecções adquiridas na comunidade (Falagas et al., 2007). Sendo assim, a exposição ambiental a espécies de *Acinetobacter* deve ser considerada como agente potencial de doença. Apesar de vários estudos abrangerem a distribuição e resistência antimicrobiana de espécies de *Acinetobacter* isoladas no ambiente hospitalar, poucos focam em isolados ambientais (Zeana et al., 2003).

No presente trabalho as 3 cepas isoladas de efluente hospitalar foram identificadas como *A. baumannii*. Zhang et al. (2013) da mesma forma isolaram *A. baumannii* de esgoto hospitalar. Heuer et al. (2002) e Guardabassi et al. (1998) também identificaram *Acinetobacter* sp. em efluentes hospitalares, demonstrando que o ambiente aquático contribui para a dispersão destes microrganismos (Baquero et al., 2008).

Nesta pesquisa os 16 isolados clínicos foram identificados como *A. baumannii* corroborando com outros relatos de que esta é a espécie mais comumente associada a infecções hospitalares (Seifert et al., 1993; Gundi et al., 2009). Porém outras espécies tem sido relatadas neste ambiente como observado por Karah et al. (2011) que identificou *A. pittii* (gen. sp. 3) e *A. nosocomialis* (gen. sp. 13TU) como as cepas mais prevalentes entre 113

isolados de culturas de sangue. O trabalho de Gundi et al. (2009), também relata número significativo da *A. pittii* e *A. haemolyticus* em isolados clínicos, sendo que a alta prevalência de *A. pittii* em espécimes clínicos já foi documentada anteriormente na Ásia e Europa (Tjernberg & Ursing, 1989; Dijkshoorn et al., 1993; Horrevorts et al., 1995; Chu et al., 1999; Houang et al., 2001; Idzenga et al., 2006).

Ainda Gundi et al. (2009) identificaram 5 isolados de *A. schindleri* entre 99 isolados clínico avaliados e Dortet et al. (2006) também identificaram *A. schindleri* em seu estudo. Karah et al. (2011), reportaram pela primeira vez a relevância clínica da espécie *A. soli* que até então só tinha sido isolada do solo de floresta (Kim et al., 2008).

A subestimada descrição destas espécies é atribuída principalmente aos problemas encontrados na identificação por testes fenotípicos comerciais, que não são capazes de fazer a correta distinção entres as espécies de *Acinetobacter* (Dortet et al., 2006; Gundi et al., 2009).

Com base no presente estudo e demais trabalhos já publicados, o gene *rpoB*, demonstra ser uma ferramenta molecular simples que permite a identificação rápida e precisa de espécies de *Acinetobacter*, o que ajudará na identificação da relação entre espécies de *Acinetobacter* emergentes e resultados clínicos, incluindo cepas do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*. Ainda, estes resultados auxiliarão no entendimento da epidemiologia destas bactérias (La Scola et al., 2006; Gundi et al., 2009; Karah et al., 2011).

4.2 Análise dos mecanismos de resistência ao IMP e CAZ nos isolados

As OMPs foram fenotipicamente analisadas nos isolados e seus revertentes, rev1 cultivado na ausência de antimicrobiano e rev2 cultivado em concentrações crescentes de IMP e CAZ, para avaliar a influência destes antimicrobianos no perfil de expressão de OMPs.

No teste para a produção de rev1 ao IMP observou-se que dos 19 isolados, 10 tornaram-se sensíveis ao IMP após onze cultivos em TSA sem o antimicrobiano (CIM entre 4 a $<1 \mu\text{g/mL}$) e 7 isolados tornaram-se sensíveis após vinte e cinco cultivos em TSA sem o IMP (CIM entre 4 a $2 \mu\text{g/mL}$). Quando os rev1 foram cultivados em TSA contendo valores crescentes de 4 a $32 \mu\text{g/mL}$ de IMP, os valores de CIM de todos isolados aumentaram (CIM entre 8 a $256 \mu\text{g/mL}$), obtendo-se os rev2 resistentes ao IMP (Tabela 5). Já no teste para a produção de rev1 a CAZ, nenhum isolado tornou-se sensível a este antimicrobiano. IC269 e O6 apenas apresentaram uma redução na CIM. Depois de cultivados sucessivamente em concentrações crescentes de 4 a $64 \mu\text{g/mL}$ de CAZ, todos isolados apresentaram CIM a CAZ $>512 \mu\text{g/mL}$, obtendo-se os rev2 (Tabela 5).

Destes 17 isolados que se tornaram sensíveis ao IMP, em 14 (IC 23, IC 32, IC 53, IC 70, IC 133, IC 147, IC 188, IC 269, IC 299, IC 301, IC 302, O6, O17 e G47h) o perfil de OMPs foi igual e manteve-se inalterado durante a obtenção dos revertentes, no qual quatro proteínas foram predominantes Omp1(50,8-kDa), Omp2 (38,3-kDa), Omp3 (29,3-kDa) e Omp4 (25,8-kDa), sendo que todas estavam presentes em rev1 e rev2 indicando que nestes

isolados, a presença dos antimicrobianos no meio de cultura não influenciou no perfil de expressão das OMPs e que a resistência ao IMP e CAZ parece não estar relacionada à perda de expressão de OMPs (Figura 6).

TABELA 5: CIM ao IMP e CAZ dos isolados e seus revertentes.

ISOLADOS	CIM ($\mu\text{g/mL}$)							
	IMP	IMP rev1*	IMP rev1**	IMP rev2	CAZ	CAZ rev1*	CAZ rev1**	CAZ rev2
IC 23	16	<1	-	16	>512	>512	>512	>512
IC 32	32	4	-	64	>512	>512	>512	>512
IC 53	128	8	4	64	>512	>512	>512	>512
IC 70	32	4	-	16	>512	>512	>512	>512
IC 133	64	16	4	16	>512	>512	>512	>512
IC 147	16	4	-	32	>512	>512	>512	>512
IC 186	16	8	4	32	>512	>512	>512	>512
IC 188	32	4	-	32	>512	>512	>512	>512
IC 220	128	32	32	256	>512	>512	>512	>512
IC 269	16	2	-	8	512	256	128	>512
IC 283	64	16	8	64	>512	>512	>512	>512
IC 289	64	8	4	32	>512	>512	>512	>512
IC 294	16	4	-	16	>512	>512	>512	>512
IC 299	32	8	4	32	>512	>512	>512	>512
IC 301	16	16	4	32	>512	>512	>512	>512
IC 302	32	8	2	64	>512	>512	>512	>512
O6	32	<1	-	8	512	512	256	>512
O17	32	2	-	32	>512	>512	>512	>512
G47h	32	4	-	16	>512	>512	>512	>512

CIM: concentração inibitória mínima; IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; rev: revertente. rev1*: obtido após 11 cultivos em ágar tripton de soja (TSA) sem o antimicrobiano. rev1**: obtido após 25 cultivos em TSA sem o antimicrobiano. rev2***: obtido após cultivos em TSA com concentrações crescentes do antimicrobiano. Pontos de corte da CIM para IMP: $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ (sensível), $8 \mu\text{g/mL}$ (intermediário) e $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ (resistente). Pontos de corte da CIM para CAZ: $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ (sensível), $16 \mu\text{g/mL}$ (intermediário) e $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ (resistente).

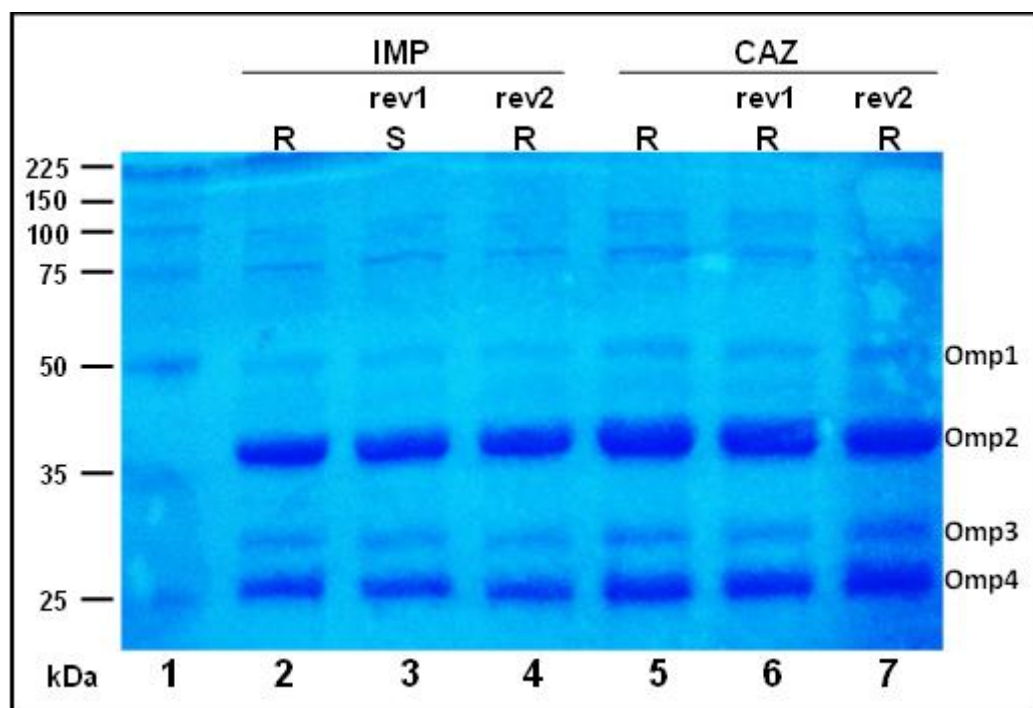


FIGURA 6: Perfil de OMPs mais frequentemente encontrado nos isolados, sem alteração durante a obtenção dos revertentes. Análise por SDS-PAGE (15% de poliacrilamida). IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; R: resistente; S: sensível. rev1: revertente 1 cultivado na ausência de antimicrobiano; rev2: revertente 2 cultivado na presença de antimicrobiano. Canaletas 1: Marcador; 2: IC 269 – resistente ao IMP; 3: rev1 IC 269 – sensível ao IMP; 4: rev2 IC 269 – resistente ao IMP; 5: IC 269 – resistente a CAZ; 6: rev1 IC 269 – resistente a CAZ; 7: rev2 IC 269 – resistente a CAZ. Proteínas observadas: Omp1 (50,8-kDa), Omp2 (38,3-kDa), Omp3 (29,3-kDa) e Omp4 (25,8-kDa).

Os resultados de produção dos revertentes assemelham-se ao de Tomás et al. (2005), que após 11 cultivos de um isolado clínico de *A. baumannii* em ágar Luria-Bertani (LB), observou que o mesmo tornou-se sensível ao IMP porém não a CAZ. E que após cultivos sucessivos do revertente sensível em concentrações crescentes de IMP, a CIM a este antimicrobiano aumentou e obteve-se o revertente resistente. Contudo neste mesmo estudo, o perfil de OMPs no isolado e seus revertentes foi analisado por SDS-PAGE e indicou o desaparecimento de uma OMP de 33- a 36-kDa na

cepa resistente, sugerindo que a perda desta proteína estaria relacionada a resistência aos carbapenêmicos.

Esta proteína de 33- a 36-kDa não foi observada nos 14 isolados citados e não houve associação da resistência ao IMP e CAZ com perda de expressão de outras OMPs. Deste modo, nestes isolados a resistência ao IMP pode estar associada aos outros mecanismos estudados, assim como para CAZ. Conforme a Tabela 6, em cinco isolados (IC 133, IC 147, IC 299, IC 301 e IC 302) não houve diminuição significativa da CIM ao IMP e CAZ na presença do inibidor de bomba de próton CCCP e nenhum dos genes do sistema AdeABC foi detectado, portanto este mecanismo parece não estar contribuindo para a resistência ao IMP e CAZ nos mesmos. Nos isolados IC 147, IC 299, IC 301 e IC 302 a resistência pode ser conferida pelas β -lactamases do tipo OXA-23 e OXA-51 presentes, sendo que em IC 299, IC 301 e IC 302 a sequência de inserção IS*Aba*1 também foi detectada anteriormente ao gene *bla*_{OXA-51}, o que pode estar contribuindo para a hiperexpressão das β -lactamases. Já no isolado IC 133, a resistência ao IMP e CAZ está possivelmente associado a um mecanismo não analisado neste trabalho, pois nenhum gene para bomba de efluxo e β -lactamase foi detectado.

Dos isolados IC 23, IC 32, IC 53, IC 70, IC 188, IC 269, O6, O17 e G47h, somente o isolado O17 teve CIM ao IMP diminuída duas vezes na presença de CCCP e em todos, dois ou mais genes do sistema AdeABC foram detectados. Neles também estavam presentes os genes *bla*_{OXA-23} ou *bla*_{OXA-51}

TABELA 6: CIM dos isolados ao IMP e CAZ na presença e ausência de CCCP, detecção dos genes *adeA*, *adeB*, *adeC*, *adeR*, *adeS*, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} e a sequência de inserção *ISAba1* e perfil fenotípico das OMPs.

ISOLADOS	CIM (µg/mL)				<i>adeA</i> *	<i>adeB</i> *	<i>adeC</i> *	<i>adeR</i> *	<i>adeS</i> *	OXA-51**	OXA-23**	ISAba1***	OMPs
	IMP	IMP+ CCCP	CAZ	CAZ+ CCCP									
IC 23	16	16	>512	>512	+	-	+	+	+	+	-	-	-
IC 32	32	32	>512	>512	+	-	-	+	+	+	+	+	-
IC 53	128	128	>512	>512	+	+	-	+	+	+	+	+	-
IC 70	32	16	>512	>512	+	+	+	+	+	+	+	+	-
IC 133	64	64	>512	>512	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IC 147	16	16	>512	>512	-	-	-	-	-	+	+	-	-
IC 186	16	16	>512	>512	+	+	+	+	+	-	+	+	+
IC 188	32	32	>512	>512	+	+	-	-	-	+	+	+	-
IC 220	128	64	>512	>512	+	+	+	+	+	+	+	+	-
IC 269	16	16	512	>512	-	+	+	+	+	+	-	+	-
IC 283	64	64	>512	>512	+	+	+	+	+	+	-	+	+
IC 289	64	64	>512	>512	-	-	-	-	-	+	+	+	+
IC 294	16	8	>512	>512	-	+	+	-	-	+	+	+	+
IC 299	32	16	>512	>512	-	-	-	-	-	+	+	+	-
IC 301	16	8	>512	>512	-	-	-	-	-	+	+	+	-
IC 302	32	32	>512	>512	-	-	-	-	-	+	+	+	-
O6	32	32	512	512	+	+	-	+	+	+	+	-	-
O17	32	8	>512	>512	+	-	+	+	+	+	+	-	-
G47H	32	32	>512	>512	+	+	+	+	+	+	-	-	-

CIM: concentração inibitória mínima; IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; CCCP: carbonyl cyanide 3 chlorophenylhydrazone. Na coluna das OMPs o sinal positivo (+) indica modificação do perfil e negativo (-) sem modificação do perfil. *Dados obtidos de Hain (2013) e Marchetti (2010). **Dados obtidos de Ferreira (2010). ***Dados obtidos de Gusatti (2011). Como todos isolados foram negativos para as β-lactamases OXA-24, OXA-58 e metalo-β-lactamases IMP, VIM e SPM, estes dados não foram incluídos na tabela.

ou ambos, e na maioria a sequência de inserção IS*Aba1* também foi observada (Tabela 6). Portanto nestes isolados, bomba de efluxo e/ou β -lactamases podem estar atuando na resistência ao IMP e CAZ.

No trabalho de Bratu et al. (2008) a expressão de OmpA em *A. baumannii* também não foi relacionada à resistência a cefalosporinas. Esta resistência esteve associada às cefalosporinases do tipo AmpC, e na ausência destas, a resistência foi associada ao sistema de efluxo AdeABC, que atuou como primeiro mecanismo para redução da susceptibilidade ao cefepime.

No mesmo trabalho a expressão e mudanças fenotípicas de OmpA e bomba de efluxo não foram associadas a resistência aos carbapenêmicos, sendo que foi citada a associação da sequência de inserção IS*Aba1* com a carbapenemase do tipo OXA-51 como importante contribuinte para a resistência a estes antimicrobianos em *A. baumannii* (Su et al., 2005; Hu et al., 2007).

No presente estudo 3 isolados (IC186, IC289 e IC294) que os rev1 tornaram-se sensíveis ao IMP, apresentaram alteração no perfil de OMPs (Tabela 5). IC 186 e IC 294 tiveram o mesmo perfil de OMPs, correspondente a Figura 7, o qual foi alterado quando na presença de IMP e CAZ no meio de cultura. Observa-se na Figura 7 que o isolado IC186 cultivado na presença de IMP e CAZ, apresentou uma proteína de 33-kDa (Omp5, seta preta) não encontrada nos demais isolados. Esta proteína desapareceu quando o isolado foi cultivado na ausência dos antimicrobianos (rev1). A Omp2 foi mais expressa na presença dos antimicrobianos. Além disso, uma proteína de 34- a 36-kDa (Omp6, seta vermelha) observada na ausência dos antimicrobianos, pareceu

estar ausente ou sobreposta pela Omp2 quando o isolado foi cultivado na presença de IMP e CAZ. Pôde-se observar também que Omp1 desapareceu na ausência do antimicrobiano e uma proteína de 53-kDa (Omp7, seta amarela) foi expressa. E que uma ou as duas proteínas Omp3 e Omp4 foram mais expressas.

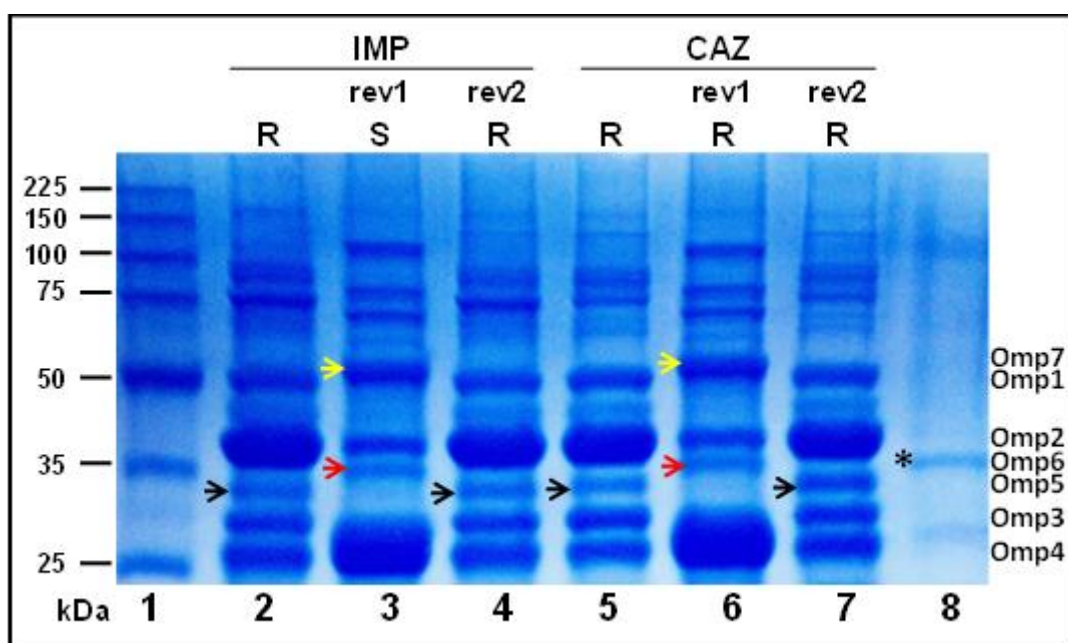


FIGURA 7: Perfil de OMPs de IC 186. Análise por SDS-PAGE (15% de poliacrilamida). IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; R: resistente; S: sensível. rev1: revertente 1 cultivado na ausência de antimicrobiano; rev2: revertente 2 cultivado na presença de antimicrobiano. Canaletas 1: Marcador; 2: IC186 resistente ao IMP; 3: rev1 IC 186 – sensível ao IMP; 4: rev2 IC186 – resistente ao IMP; 5: IC 186 resistente a CAZ; 6: rev1 IC 186 – resistente a CAZ; 7: rev2 IC 186 – resistente a CAZ. Proteínas observadas: Omp1 (50,8-kDa), Omp2 (38,3-kDa), Omp3 (29,3-kDa), Omp4 (25,8-kDa), Omp5 (33-kDa, seta preta), Omp6 (34 a 36-kDa, seta vermelha) e Omp7 (53-kDa, seta amarela). Canaleta 8: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), asterisco indica a OmpA.

Portanto, para os isolados IC 186 e IC 294 a presença de IMP e CAZ causou a modificação do perfil das OMPs, sugerindo que estas proteínas estão contribuindo para a resistência aos antimicrobianos testados, seja pela perda

ou substituição de OMPs. Estes dois isolados não diminuíram a CIM ao IMP e CAZ na presença de CCCP. Em IC 186 foram detectados todos os genes do sistema AdeABC, o gene *bla*_{OXA-23} e a sequência de inserção IS*Aba*1. Em IC 294 os genes *adeA*, *adeR* e *adeS* não foram detectados. Todavia, os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}, e a sequência de inserção IS*Aba*1 foram detectados (Tabela 6).

Na análise do perfil das OMPs do isolado IC 289 observa-se na Figura 8, que ao ser cultivado na presença de IMP e CAZ, Omp7, Omp6 e Omp4 não foram expressas. Já quando cultivado na ausência de antimicrobiano, Omp6 e Omp4 foram expressas, Omp7 e Omp1 fracamente expressas e Omp2 e Omp3 desapareceram. Deste modo, neste isolado a presença de IMP e CAZ também contribuiu para seu fenótipo de resistência pela perda ou substituição de OMPs. Quanto aos outros mecanismos de resistência avaliados, não foi observada diminuição da CIM ao IMP e CAZ na presença de CCCP e os genes do sistema AdeABC não foram detectados. Entretanto foi positivo para os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}, e a sequência de inserção IS*Aba*1 (Tabela 6).

IC 220 e IC 283 são os isolados que não se tornaram sensíveis ao IMP após os 25 cultivos em TSA sem antimicrobiano para a obtenção de rev1, apesar de terem a CIM diminuída (Tabela 5). IC 220 apresentou perfil de OMPs igual à Figura 6, que não foi alterado pela presença dos antimicrobianos. Não houve diminuição da CIM ao IMP e CAZ na presença de CCCP, mas todos os genes do sistema AdeABC foram detectados. Os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}, e a sequência de inserção IS*Aba*1 também foram detectados (Tabela 6).

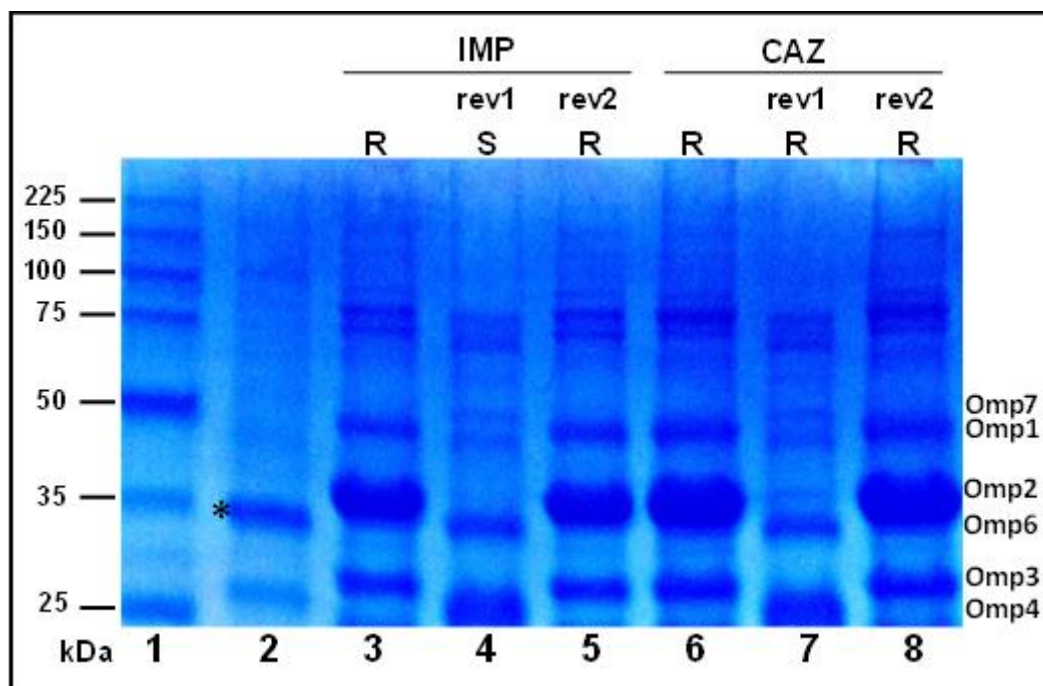


FIGURA 8: Perfil de OMPs de IC 289. Análise por SDS-PAGE (15% de poliacrilamida). IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; R: resistente; S: sensível. rev1: revertente 1 cultivado na ausência de antimicrobiano; rev2: revertente 2 cultivado na presença de antimicrobiano. Canaletas 1: Marcador; 2: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), asterisco indica a OmpA; 3: IC 289 resistente ao IMP; 4: rev1 IC 289 – sensível ao IMP; 5: rev2 IC 289 – resistente ao IMP; 6: IC 289 – resistente a CAZ; 7: rev1 IC 289 – resistente a CAZ; 8: rev2 IC 289 - resistente a CAZ. Proteínas observadas: Omp1 (50,8-kDa), Omp2 (38,3-kDa), Omp3 (29,3-kDa), Omp4 (25,8-kDa), Omp6 (34 a 36-kDa) e Omp7 (53–kDa).

Apesar de as OMPs aparentemente não estarem contribuindo para a resistência em IC 220, a elevada resistência ao IMP e CAZ pode ser atribuída ao fato de que todos os outros mecanismos foram detectados, colaborando para este fenótipo e talvez por isso não foi conseguido o rev1 sensível ao IMP neste isolado.

Por outro lado, no isolado IC 283 além de terem sido detectados todos os genes do sistema AdeABC, *bla*_{OXA-51} e a sequência de inserção IS*Aba1*, o perfil de OMPs também foi alterado. Todos estes mecanismos de

resistência atuando, podem justificar o fato de não ter sido obtido o rev1 sensível ao IMP deste isolado.

A alteração no perfil de OMPs em IC 283 foi observada somente quando o isolado foi cultivado na presença de IMP e com características diferentes dos outros isolados. Pode-se observar na Figura 9 que o isolado cultivado na ausência de IMP (canaleta 3), o perfil é igual ao de IC 289 cultivado na presença do IMP (Figura 8, canaleta 3).

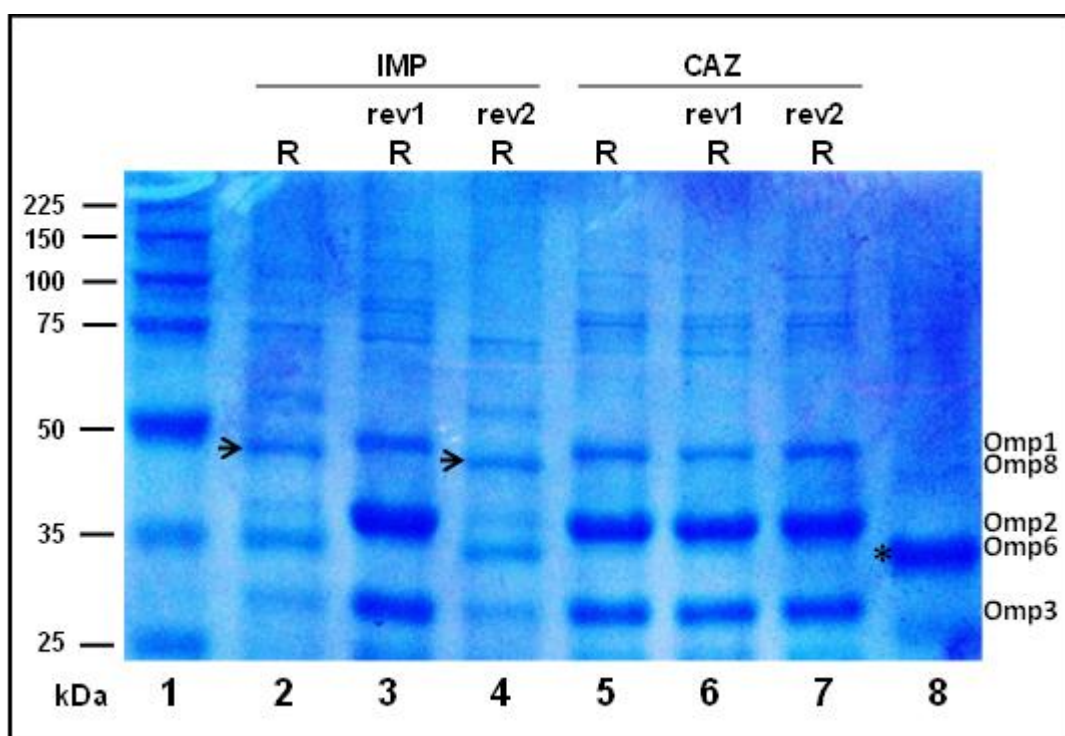


FIGURA 9: Perfil de OMPs de IC 283. Análise por SDS-PAGE (15% de poliacrilamida). IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; R: resistente; S: sensível. rev1: revertente 1 cultivado na ausência de antimicrobiano; rev2: revertente 2 cultivado na presença de antimicrobiano. Canaletas 1: Marcador; 2: IC 283 resistente ao IMP; 3: rev1 IC 283 – resistente ao IMP; 4: rev2 IC 283 – resistente ao IMP; 5: IC 283 resistente a CAZ; 6: rev1 IC 283 – resistente a CAZ; 7: rev2 IC 283 – resistente a CAZ. Proteínas observadas: Omp1 (50,8-kDa), Omp2 (38,3-kDa), Omp3 (29,3-kDa), Omp6 (34- a 36-kDa) e Omp8 (46,8-kDa, seta). 8: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), asterisco indica a OmpA.

Portanto, IC 283 se comporta de forma diferente frente ao IMP, pois na presença do antimicrobiano o perfil de OMPs é ainda diferente dos demais isolados, em que uma proteína de 46,8-kDa (Omp8, indicada pela seta na Figura 9) foi observada; Omp1 presente nos outros isolados, em IC 283 está ausente; Omp2 e Omp3 praticamente desaparecem sendo que nos outros isolados são expressos na presença de IMP; Omp6, encontrada somente na ausência de antimicrobiano, em IC 283 ela está expressa na presença de IMP e Omp4 não foi observada (Figura 9). São características contraditórias aos demais isolados, porém que comprovam que o IMP pode alterar o perfil das OMPs, não necessariamente atuando diretamente na resistência a este antimicrobiano.

Distintos perfis de OMPs foram encontrados entre os isolados desta pesquisa. Em concordância com o trabalho de Fernández-Cuenca et al. (2003), que também observou diferentes perfis de OMPs entre isolados de *A. baumannii*. Neste mesmo trabalho a resistência aos carbapenêmicos em alguns isolados foi associada à perda da expressão de uma proteína de 22,5-kDa. No trabalho de Bou et al. (2000), foram observadas cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos sem uma proteína de 22-kDa. Porém no presente estudo esta proteína não foi observada.

Apesar de em 3 isolados (IC 186, IC 289 e IC 294), ter sido observada modificação no perfil de OMPs nos testes realizados com CAZ, a resistência a este antimicrobiano é associada principalmente com outros mecanismos como presença de cefalosporinases e de sistema de efluxo (Bratu et al., 2008). Apesar disso, os resultados do presente estudo podem ser uma

confirmação de que as OMPs podem atuar na resistência a CAZ, visto que já foi demonstrado que outros antimicrobianos da classe das cefalosporinas podem se difundir pelas OMPs (Sugawara & Nikaido, 2012).

Cada vez mais são reportadas cepas de *A. baumannii* resistentes ao IMP e as porinas têm sido associadas a esta resistência (Luo et al., 2011). Diante da relevância da resistência relacionada aos carbapenêmicos em cepas multirresistentes de *A. baumannii*, as considerações a seguir sobre as modificações nos perfis de OMPs, se concentrarão nos resultados realizados com o IMP, sumarizados na Tabela 7.

Omp1 com 50,8-kDa, foi observada em praticamente todos isolados, e seus revertentes, com exceção de IC 186 e IC 294 cujos rev1 sensíveis ao IMP não expressaram esta proteína e rev2 resistente ao IMP de IC 283, que também não expressou Omp1. Uma proteína de 50-kDa foi identificada por Vashist et al. (2011) como uma proteína transportadora da membrana externa. Esta proteína teve regulação diminuída nas cepas resistentes ao meropenem em relação à cepa padrão ATCC 19606 sensível. Entretanto, por se tratar de um transportador lipídico, e os β -lactâmicos serem hidrofílicos, a baixa regulação desta proteína nas cepas resistentes ao meropenem foi atribuída à resistência a outros antimicrobianos. No presente trabalho, se Omp1 de fato corresponde a uma proteína transportadora lipídica, justifica o fato de ter sido encontrada tanto nos revertentes sensíveis e resistentes ao IMP, pois este antimicrobiano não utiliza esta proteína para penetrar na célula. Enquanto a ausência desta proteína pode ser devido à ação de reguladores globais da

expressão de OMPs que podem ter interferido na expressão desta proteína (Viveiros et al., 2007).

TABELA 7: Perfis de OMPs encontrados em rev1 e rev2 ao IMP nos isolados.

OMPs	Perfil mais frequente*		IC 186/IC 294		IC 289		IC 283	
	rev1	rev2	rev1	rev2	rev1	rev2	rev1	rev2
	S	R	S	R	S	R	R	R
Omp1 (50,8-kDa)	X	X	-	X	MF	X	X	-
Omp2 (38,3-kDa)	X	X	MF	X	-	X	X	-
Omp3 (29,3-kDa)	X	X	X	X	-	X	X	X
Omp4 (25,8-kDa)	X	X	X	X	X	-	-	-
Omp5 (33-kDa)	-	-	-	X	-	-	-	-
Omp6 (34-35-kDa)	-	-	X	-	X	-	-	X
Omp7 (53-kDa)	-	-	X	-	MF	-	-	-
Omp8 (46,8-kDa)	-	-	-	-	-	-	-	X

IMP: imipenem; R: resistente; S: sensível. rev1: revertente 1 cultivado na ausência de antimicrobiano; rev2: revertente 2 cultivado na presença de antimicrobiano. *Perfil correspondente aos 14 isolados (IC 23, IC 32, IC 53, IC 70, IC 133, IC 147, IC 188, IC 269, IC 299, IC 301, IC 302, O6, O17 e G47h) que os rev1 se tornaram sensíveis ao IMP. O isolado IC 220 também apresentou este perfil, porém rev1 permaneceu resistente ao IMP. MF: banda mais fraca.

Omp2 de 38,3-kDa, foi identificada com 41% de cobertura com a proteína Omp38 de *A. baumannii*, pertencente a família OmpA, por isso também denominada de OmpAb (Jyothisri et al., 1999) e também relatada como HMP-AB (Gribun et al., 2003). Ela esteve fenotipicamente menos expressa nos rev1 sensíveis ao IMP de IC 186 e IC 294 e não foi observada no rev1 sensível de IC 289, nem no rev1 resistente de IC 283, não podendo associá-la claramente a resistência ao IMP (Tabela 7). Bratu et al. (2008)

também não encontraram diminuição da expressão de OmpA relacionada a resistência aos carbapenêmicos. Já Sugawara & Nikaido (2012) demonstraram que cepas mutantes sem OmpA, foram defeituosas na captação de cefalosporinas hidrofílicas, sugerindo que esta é a maior OMP não específica em *A. baumannii*.

Contudo, a baixa permeabilidade de OmpA pode não estar associada a sua baixa expressão e sim a sua conformação. OmpA é descrita como uma proteína com dois domínios, com sua região N-terminal inserida parcialmente na membrana externa e a região C-terminal parcialmente enovelada em um domínio globular no periplasma. Porém esta conformação pertence a uma parte das proteínas da família OmpA. Uma minoria de proteínas enovelam-se de forma diferente, em um único domínio, que corresponde a conformação com o canal aberto (Sugawara & Nikaido, 2012). Portanto apesar de Omp2=OmpA ser observada nos isolados, não significa que a mesma encontra-se na conformação de canal aberto.

Outra proteína descrita e que parece estar envolvida na resistência aos carbapenêmicos é a CarO de 29-kDa, sendo que outra proteína de 25-kDa (Omp25), foi detectada estar junto a ela. As duas proteínas adotam uma conformação típica de β -barril, mas somente uma delas tem propriedades de formação de poros (Siroy et al., 2005). No presente estudo foram encontradas duas OMPs com pesos moleculares semelhantes Omp3 de 29,3-kDa e Omp4 de 25,8-kDa. Ambas foram encontradas em revertentes resistentes e sensíveis ao IMP. Porém em IC 289 no rev1 sensível ao IMP, Omp3 não foi expressa e Omp4 foi expressa, enquanto que no rev2 resistente, o contrário foi observado.

No isolado IC 283 rev1 e rev2 resistentes ao IMP, Omp4 não foi observada (Tabela 7).

Já foi demonstrado que as isoformas de CarO são responsáveis pela formação de canais de difusão não específicos com papel importante na resistência aos carbapenêmicos (Siroy et al., 2005; Mussi et al., 2007). No trabalho de Vashistt et al. (2011), CarO apareceu com duas isoformas de peso molecular de 25-kDa e 26-kDa. A migração diferente destas proteínas pode ser devido mudanças em seu nível primário que parece interferir no sua função, como alteração no meio de difusão. Foi sugerido que a exposição ao meropenem resultou em alterações nos resíduos internos que modificaram a migração destas proteínas. Enquanto as isoformas de 29-kDa e 26-kDa tiveram expressão diminuída nas cepas de *A. baumannii* com resistência baixa e intermediária ao meropenem em comparação com a cepa padrão ATCC 19606 sensível, a isoforma de 25-kDa teve a expressão aumentada nas cepas resistentes.

Na presente pesquisa, Omp5 de 33-kDa foi observada somente no rev2 resistente de IC 186 e IC 294 (Tabela 7). Bou et al. (2000) reporta a redução da expressão de uma proteína de 33-kDa relacionada a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*, porém Bratu et al. (2008) cita esta proteína como sendo a mesma proteína de 33 a 36-kDa (cujo peso molecular se assemelha mais a Omp6 do presente estudo).

Conforme já citado, Tomás et al. (2005) associou a perda de expressão de uma proteína de 33 a 36-kDa com resistência ao IMP em *A. baumannii*. Pode-se observar na Tabela 7, que Omp6 (34-35-kDa) de peso

molecular semelhante, foi encontrada nos rev1 sensíveis ao IMP de IC 186, IC 294 e IC 289 e não foi observada nos rev2 resistentes destes isolados. Apesar de ter sido observada no rev2 resistente ao IMP de IC 283, a perda da expressão desta proteína nos isolados pode estar contribuindo para a resistência ao IMP (Tabela 7).

Omp7 de 53-kDa, foi observada somente nos rev1 sensíveis ao IMP de IC 186, IC 294 e IC 289 (Tabela 7). Porém não foi encontrada nenhuma citação que reportasse uma OMP com este peso molecular em *Acinetobacter* sp.

Omp8 de 46,8-kDa foi encontrada somente em rev2 de IC 283. Uma proteína de peso molecular próximo (47-kDa), foi descrita por Vashistt et al. (2011) em *A. baumannii* como sendo homóloga a OprD de *A. pittii*. Neste mesmo trabalho esta proteína apresentou diminuição da expressão em cepas com baixa e intermediária resistência ao meropenem, todavia esteve 4 vezes mais expressa em cepas com alta resistência a este antimicrobiano. Em outros trabalhos com *A. baumannii*, OprD é descrita com peso molecular de 43-kDa e neles não foi associada a resistência aos carbapenêmicos (Siroy et al., 2006; Catel-Ferreira et al., 2012; Smani & Pachón, 2013). O contrário é reportado por Dupont et al. (2005).

A falta de concordância entre os resultados dos trabalhos citados não esclarece a relação de OprD com a resistência a antimicrobianos em *A. baumannii*. Contudo é sugerido que durante as fases iniciais de resistência antimicrobiana, *A. baumannii* faça uso de várias porinas incluindo OprD,

enquanto que na fase de alta resistência faça uso de outras porinas (Vashistt et al., 2011).

É proposto que durante a evolução da resistência aos antimicrobianos, as bactérias se utilizem da baixa regulação ou alteração de porinas como primeiro passo de defesa, e esta baixa regulação seguiria de forma sequencial para combater os efeitos bactericidas de antimicrobianos hidrofílicos. Apesar da baixa regulação de algumas proteínas, várias OMPs têm sua regulação aumentada, como um meio de adaptação das bactérias resistentes à exposição aos antimicrobianos (Vashistt et al., 2011). Isto pode ocorrer por mudanças nas conformações das porinas ou também pela substituição de OMPs por outras (Peleg et al., 2008; Delcour, 2009; Vashistt et al., 2011). Isto vai de acordo com os achados do presente trabalho, pois em 4 isolados foram observadas alterações nos perfis de OMPs quando na presença ou ausência de antimicrobianos.

Com base nos resultados expostos, na maioria dos isolados mais de um mecanismo de resistência a antimicrobianos pôde ser identificado, o que contribui para o fenótipo de multirresistência em *Acinetobacter* sp. Esta combinação de vários mecanismos de resistência em um mesmo microrganismo tem sido observada em outros bacilos Gram negativos (Fernández-Cuenca, 2003).

Bou et al. (2000), associaram a resistência aos carbapenêmicos com enzimas do tipo OXA e perda de expressão de OMPs em uma cepa resistente ao imipenem e meropenem.

A resistência a antimicrobianos pela associação da expressão de porinas e sistemas de efluxo também é reportada, visto que alguns componentes da cascata de regulação do sistema Mdr podem negativamente regular a expressão de porinas não específicas (Misra & Reeves, 1987; Gambino et al., 1993; Ariza et al., 1995; George, 1996; Nikaido, 1996; Okusu et al., 1996). Esta associação foi reportada por Luo et al. (2011), que em análise proteômica de OMPs em uma cepa de *A. baumannii* sensível ao IMP e seu clone resistente (isolado após administração de antimicrobiano in vivo), demonstrou que OprD e CarO tiveram expressão diminuída na cepa resistente, concluindo que tais proteínas podem ter importante papel na regulação da resistência ao IMP, sugerindo ainda que a superexpressão de bomba de efluxo em conjunto com a baixa expressão de OprD e CarO, contribuíram para a resistência induzida ao IMP na cepa estudada.

Isto corrobora com relatos de que a pressão exercida por antimicrobianos leva a emergência de cepas com características modificadas do envelope celular, como na impermeabilidade da membrana ou nos mecanismos de efluxo, bem como aumento do nível basal da atividade de cefalosporinases (Charrel et al., 1996; Hopkins & Towner, 1990). O que pode justificar também a elevada resistência a CAZ nos isolados avaliados no presente estudo.

Tanto durante o tratamento de infecções como no meio ambiente, as bactérias são expostas a concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos e esta exposição induz mudanças no perfil de expressão de uma grande quantidade de genes, resultando em diferentes fenótipos (Viveiros et al., 2007;

Peleg et al., 2008). Como por exemplo, no trabalho de Viveiros et al. (2007), quando uma cepa de *E. coli* foi exposta a concentrações sub-letais de tetraciclina e a resistência foi elevada pelo aumento da expressão de bombas de efluxo e diminuição da regulação de porinas.

Portanto são vários os fatores que podem estar contribuindo para a resistência aos antimicrobianos nos isolados de *A. baumannii* estudados. Além dos mecanismos pesquisados outros não testados podem estar presentes, principalmente em IC 133 em que a resistência não foi associada a nenhum dos mecanismos avaliados. Dentre eles podem ser citadas a modificação de PBPs, outras β -lactamases e outros sistemas de efluxo já descritos em outros trabalhos (Fernández-Cuenca et al., 2003; Luo et al., 2011; Park et al., 2012) Além dos mecanismos desconhecidos como novas carbapenemases.

A ação combinada entre diferentes mecanismos de resistência a antimicrobianos em *A. baumannii* pode explicar a elevada resistência que esta espécie tem expressado. Por isso a importância de cada mecanismo ser elucidado e melhor compreendido.

5. CONCLUSÕES

1- Para a identificação das espécies de *Acinetobacter* dos isolados estudados, o gene *rpoB* demonstrou ser mais discriminatório que o gene 16S rRNA, conseguindo identificar de forma precisa os 19 isolados.

2- Em 15 isolados o perfil fenotípico de OMPs não foi alterado pela presença dos antimicrobianos IMP e CAZ, tendo a resistência antimicrobiana atribuída a outros mecanismos.

3- Foi observada alteração no perfil de OMPs em quatro isolados quando cultivados na presença e ausência de IMP e CAZ. Apesar de estas modificações nos perfis não terem tido um padrão único, podem também estar colaborando para a resistência ao IMP e CAZ nos isolados, visto que a substituição de OMPs constitui um mecanismo de resistência antimicrobiana. Contudo esta substituição necessita ser melhor estudada.

4- A perda da expressão de Omp6 e Omp7 pôde ser associada à resistência ao IMP em três isolados cujos revertentes sensíveis apresentaram estas proteínas e os revertentes resistentes deixaram de expressá-las, demonstrando que estas OMPs podem estar contribuindo para a resistência a este antimicrobiano.

5- Na maioria dos isolados mais de um mecanismo de resistência a antimicrobianos foi detectado, o que pode estar resultando no fenótipo de multirresistência dos mesmos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAS

Estudos complementares quanto à expressão genotípica das OMPs ajudariam a compreender melhor como a exposição aos antimicrobianos interfere no perfil de OMPs dos isolados. Além do estudo da expressão dos genes que regulam a expressão de OMPs, PBPs, bombas de efluxo e das β -lactamases para entender como estes mecanismos atuam e como podem estar interligados.

Com o subsequente sequenciamento de Omp6 e Omp7, será possível identificar estas proteínas, a que família pertencem e esclarecer melhor o papel destas OMPs na resistência antimicrobiana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTMAN, M.; MERCER, A.; KUSECEK, B.; POHL, A.; HEUZENROEDER, M.; AARONSON, W.; SUTTON, A.; SILVER, R. P. Six widespread bacterial clones among *E. Coli* K1 isolates. **Infection and Immunity**, v. 39, v. 1, p. 315-35, 1983.

ALMEIDA, L. A.; ARAUJO, R. Highlights on molecular identification of closely related species. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 67–75, 2013.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; CULEBRAS, E.; PICAZO, J. J. Identification of *Acinetobacter* species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 345-349, 2012.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. **Series B, Biological Sciences**, v. 289, p. 321-331, 1980.

ANANDHAM, R.; WEON, H. Y.; KIM, S. J.; KIM, Y. S.; KIM, B. Y.; KWON, S. W. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 36–39, 2010.

ARIZA, R. R.; LI, Z.; RINGSTAD, N.; DEMPLE, B. Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 1655-1661, 1995.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 260-265, 2008.

BARTUAL, S. G.; SEIFERT, H.; HIPPLER, C.; LUZON, M. A. D.; WISPLINGHOFF, H.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4382–4390, 2005.

BAUMANN, P. Soil and Water Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. **Journal of Bacteriology**, v. 96, n. 1, p. 1–5, 1968.

BEBRONE, C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 12, p. 1686-1701, 2007.

BECEIRO, A.; FERNANDEZ-CUENCA, F.; RIBERA, A.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; VILA, J.; RODRIGUEZ-BANO, J.; CISNEROS, J. M.; PACHON, J.; BOU, G. False extended-spectrum beta-lactamase detection in *Acinetobacter* spp. due to intrinsic susceptibility to clavulanic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 301-308, 2008.

BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 148–165, 1996.

BERNARDS, A. T.; DIJKSHOORN, L.; VAN DER TOORN, J.; BOCHNER, B. R.; VAN BOVEN, C. P. Phenotypic characterisation of *Acinetobacter* strains of 13 DNA-DNA hybridisation groups by means of the biolog system. **Journal of Medical Microbiology**, v. 42, p. 113–119, 1995.

BERNARDS, A. T.; VAN DER TOORN, J.; VAN BOVEN, C. P.; DIJKSHOORN, L. Evaluation of the ability of a commercial system to identify *Acinetobacter* genomic species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 15, p. 303–308, 1996.

BERNARDS, M.; HARINCK, H. I. J.; DIJKSHOORN, L.; REIJDEN, T. J. K.; BROEK P. J. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 11, p. 1002–1004, 2004.

BIFULCO, J. M.; SHIREY, J. J.; BISSONNETTE, G. K. Detection of *Acinetobacter* spp. in rural drinking water supplies. **Applied Environment Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 2214–2219, 1989.

BOGAERTS, P.; NAAS, T.; EL GARCH, F.; CUZON, G.; DEPLANO, A.; DELAIRE, T.; HUANG, T. D.; LISSOIR, B.; NORDMANN, P.; GLUPCZYNSKI, Y. GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4872-4878, 2010.

BONNIN, R. A.; NORDMANN, P.; POTRON, A.; LECUYER, H.; ZAHAR, J. R.; POIREL, L. Carbapenemhydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 349-354, 2011.

- BOO, T. W.; WALSH, F.; CROWLEY, B. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital: predominance of *Acinetobacter* genomic species 3. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 209-216, 2009.
- BOU, G.; CERVERO, G.; DOMINGUEZ, M. A.; QUEREDA, C.; MARTINEZ-BELTRAN, J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3299–3305, 2000.
- BOUVET, P. J.; GRIMONT, P. A. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 228–240, 1986.
- BRATU, S.; LANDMAN, D.; MARTIN, D. A.; GEORGESCU, C.; QUALE, J. Correlation of antimicrobial resistance with β -lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York city. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 2999-3005, 2008.
- BRISOU, J.; PREVOT, A. R. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 86, n. 6, p. 722–728, 1954.
- BROWN, S.; AMYES, S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 1-3, 2006.
- BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 7, p. 1085-1089, 2001.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.
- CARR, E. L.; KAMPFER, P.; PATEL, B. K.; GURTLER, V.; SEVIOUR, R. J. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 953–963, 2003.

- CARVALHO, K. R.; CARVALHO-ASSEF, A. P.; PEIRANO, G.; SANTOS, L. C.; PEREIRA, M. J.; ASENSI, M. D. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*OXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 25-28, 2009.
- CATEL-FERREIRA, M.; NEHME, R.; MOLLE, V.; ARANDA, J.; BOUFFARTIGUES, E.; CHEVALIER, S.; BOU, G.; JOUENNE, T.; DE, E. Deciphering the function of the outer membrane protein OprD homologue of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 3826–3832, 2012.
- CAYÔ, R.; RODRIGUEZ, M. C.; ESPINAL, P.; FERNANDEZ-CUENCA, F., OCAMPO-SOSA, A. A.; PASCUAL, A.; AYALA, J. A.; VILA, J.; MARTINEZ-MARTINEZ, L. Analysis of Genes Encoding for Penicillin-Binding Proteins in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5907-5913, 2011.
- CHANG, H. C.; WEI, Y. F.; DIJKSHOORN, L.; VANEECHOUTTE, M.; TANG, C. T.; CHANG, T. C. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus* *Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1632–1639, 2005.
- CHARREL, R. N.; PAGES, J. M.; MICCO, P.; MALLEA, M. Prevalence of outer membrane porin alteration in beta-lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2854–2858, 1996.
- CHAUDHARY, H. J.; PENG, G.; HU, M.; HE, Y.; YANG, L.; LUO, Y.; TAN, Z. Genetic Diversity of Endophytic Diazotrophs of the Wild Rice, *Oryza alta* and Identification of the New Diazotroph, *Acinetobacter oryzae* sp. nov. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 4, p. 813–821, 2012.
- CHEN, T. L.; LEE, Y. T.; KUO, S. C.; HSUEH, P. R.; CHANG, F. Y.; SIU, L. K.; KO, W. C.; FUNG, C. P. Emergence and Distribution of Plasmids Bearing the *bla*OXA-51-like gene with an upstream *IS*Aba1 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4575–4581, 2010.
- CHOI, C. H.; LEE, E. Y.; LEE, Y. C.; PARK, T. I.; KIM, H. J.; Hyun, S. H.; KIM, S. A.; LEE, S. K.; LEE, J. C. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1127–1138, 2005.
- CHU, Y. W.; CHAU, S. L.; HOUANG, E. T. Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and AdeXYZ in different *Acinetobacter* genomic DNA groups. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 477-478, 2006.

CHU, Y. W.; LEUNG, C. M.; HOUANG, E. T.; NG, K. C.; LEUNG, C. B.; LEUNG, H. Y.; CHENG, A. F. Skin carriage of *Acinetobacters* in Hong Kong. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2962-2967, 1999.

CHUNG, K. T.; FERRIS, D. H. Martinus Willem Beijerinck (1851-1931): Pioneer of General Microbiology. **ASM News (Washington, D.C.: American Society For Microbiology)**, v. 62, p. 539–543, 1996.

CHUSRI, S.; VILLANUEVA, I.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P.; DAVIES, J. Enhancing antibiotic activity: a strategy to control *Acinetobacter* infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 1203–1211, 2009.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Twenty-Second edition**. Informational Supplement M100-S22. Wayne, PA, USA, 2012.

COELHO, J.; WOODFORD, N.; TURTON, J.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant *Acinetobacter* in the UK: how big a threat? **Journal of Hospital Infection**, v. 58, p. 167-169, 2004.

CORBELLA, X.; PUJOL, M.; AYATS, J.; SENDRA, M.; ARDANUY, C.; DOMINGUEZ, M. A.; LINARES, J.; ARIZA, J.; GUDIOL, F. Relevance of Digestive Tract Colonization in the Epidemiology of Nosocomial Infections Due to Multiresistant *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 8, p. 329-334, 1996.

CORNAGLIA, G.; GIAMARELLOU, H.; ROSSOLINI, G. M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 381-393, 2011.

CORRÊA, L. L.; BOTELHO, L. A. B.; BARBOSA, L. C.; MATTOS, C. S.; CARBALLIDO, J. M.; CASTRO, C. L. T.; MONDINO, P. J. J.; PAULA, G. R.; MONDINO, S. S. B.; MENDONÇA-SOUZA, C. R. V. Detection of bla-OXA-23 in *Acinetobacter* spp. isolated from patients of a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 521–526, 2012.

CORVEC, S.; CAROFF, N.; ESPAZE, E.; GIRAUDEAU, C.; DRUGEON, H.; REYNAUD, A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 629–635, 2003.

COYNE, S.; COURVALIN, P.; PERICHON, B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 947-953, 2011.

CUZON, G.; NAAS, T.; TRUONG, H.; VILLEGAS, M. V.; WISELL, K. T.; CARMELI, Y.; GALES, A. C.; VENEZIA, S. N.; QUINN, J. P.; NORDMANN, P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce betalactamase *blaKPC-2* gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. 1349-1356, 2010.

DALLA-COSTA, L. M.; COELHO, J. M.; SOUZA, H. A.; CASTRO, M. E.; STIER, C. J.; BRAGAGNOLO, K. L.; REA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S. R.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Outbreak of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 3403-3406, 2003.

DAMIER-PIOLLE, L.; MAGNET, S.; BREMONT, S.; LAMBERT, T.; COURVALIN, P. AdelJK a resistance nodulation- cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 557-562, 2008.

DE, E.; BASLE, A.; JAQUINOD, M.; SAINT, N.; MALLEA, M.; MOLLE, G.; PAGES, J. M. A new mechanism of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae induced by a structural modification of the major porin. **Molecular Microbiology**, v. 41, p. 189–198, 2001.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 5, p. 808-816, 2009.

DIJKSHOORN, L.; AUCKEN, H. M.; GERNER-SMIDT, P.; KAUFMANN, M. E.; URSING, J.; PITT, T. L. Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 702–705, 1993.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A. The diversity of the genus *Acinetobacter*. In: ***Acinetobacter Molecular Microbiology By Ulrike Gerische***. 1 ed. Caister Academic Press, Norfolk, UK, p. 1–35, 2008.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 939–951, 2007.

DIJKSHOORN, L.; TJERNBERG, I.; POT, B.; MICHEL, M. F.; URSING, J.; KERSTERS, K. Numerical analysis of cell envelope protein profiles of *Acinetobacter* strains classified by DNA–DNA hybridization. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 13, p. 338-334, 1990.

DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAGATOLLA, C.; PRANDIN, L.; MONTI-BRAGADIN, C. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1108-1113, 1995.

DOMENECH-SANCHEZ, A.; HERNANDEZ-ALLES, S.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; BENEDI, V. J.; ALBERTI, S. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 2726–2732, 1999.

DONALD, H. M.; SCAIFE, W.; AMYES, S. G.; YOUNG, H. K. Sequence Analysis of ARI-1, a Novel OXA β -Lactamase, Responsible for Imipenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 196-199, 2000.

DORTET, L.; LEGRAND, P.; SOUSSY, C. J.; CATTOIR, V. Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 4471–4478, 2006.

DUNCAN, I. B. R. Susceptibility of 1,500 Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to Gentamicin, Carbenicillin, Colistin, and Polymyxin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 5, n. 1, p. 9-15, 1974.

DUPONT, M.; PAGES, J. M.; LAFITTE, D.; SIROY, A.; BOLLET, C. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 6, p. 2386-2390, 2005.

ENDO, S.; SASANO, M.; YANO, H.; INOMATA, S.; ISHIBASHI, N.; AOYAGI, T.; HATTA, M.; GU, Y.; YAMADA, M.; TOKUDA, K.; KITAGAWA, M.; KUNISHIMA, H.; HIRAKATA, Y.; KAKU, M. IMP-1-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter ursingii* from Japan. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, 2012.

ESPINAL, P.; SEIFERT, H.; DIJKSHOORN, L.; VILA, J.; ROCA, I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. **Clinical Microbiology Infection**, v. 18, p. 1097–1103, 2011.

FALAGAS, M. E.; BLIZIOTIS I. A.; TAM, V. H. Intraventricular or intrathecal use of polymyxins in patients with gram-negative meningitis: a systematic review of the available evidence. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 9–25, 2007.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 531-536, 2004.

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

FERNANDO, D.; ZHANEL, G.; KUMAR, A. Antibiotic resistance and expression of resistance-nodulation-division pump- and outer membrane porin-encoding genes in *Acinetobacter* species isolated from Canadian hospitals. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 17-21, 2013.

FERREIRA, A. E. **Caracterização molecular e detecção de genes de resistência em isolados de *Acinetobacter* spp. de amostras clínicas e de efluente hospitalar**. Tese de doutorado apresentada no Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

FERREIRA, A. E.; MARCHETTI, D. P.; OLIVEIRA, L. M.; GUSATTI, C. S.; FUENTEFRIA, D. B.; CORÇÃO, G. Presence of OXA-23-Producing Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Wastewater from Hospitals in Southern Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 2, p. 221-227, 2011.

FERREIRA, A. E.; ROSA DA CUNHA, G.; FUENTEFRIA, D. B.; CORÇÃO, G. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em cepas de *Acinetobacter* sp. isolados de efluente hospitalar em Porto Alegre, RS. **Caderno de Farmácia**, v. 23, p. 9-14, 2007.

FU, Y.; DU, X.; JI, J.; CHEN, Y.; JIANG, Y.; YU, Y. Epidemiological characteristics and genetic structure of *bla*NDM-1 in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2114-2122, 2012.

FUNG-TOMC, J. C.; GRADELSKI, E.; KOLEK, B.; MINASSIAN, B.; PUCCI, M.; KESSLER, R. E.; BONNER, D. P. Activity of carbapenem BMS-181139 against *Pseudomonas aeruginosa* is not dependent on porin protein D2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 2, p. 386-393, 1995.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; FORWARD, K. R.; LIÑARES, J.; SADER, H. S.; 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). **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 104-113, 2001.

- GAMBINO, L.; GRACHECK, S. J.; MILLER, P. F. Overexpression of the MarA positive regulator is sufficient to confer multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 2888- 2894, 1993.
- GEHRLEIN, M.; LEYING, H.; CULLMANN, W.; WENDT, S.; OPFERKUCH, W. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin binding proteins. **Chemotherapy**, v. 37, n. 6, p. 405-412, 1991.
- GEORGE, A. M. Multidrug resistance in enteric and other Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 139, p. 1-10, 1996.
- GERNER-SMIDT, P.; TJERNBERG, I.; URSING, J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 277–282, 1991.
- GHAZAWI, A.; SONNEVEND, A.; BONNIN, R. A.; POIREL, L.; NORDMANN, P.; HASHMEY, R.; RIZVI, T. A. B.; HAMADEH, M.; PAL, T. NDM-2 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in the United Arab Emirates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 2, p. 34-36, 2012.
- GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. First Isolation of the *bla*OXA-23 Carbapenemase Gene from an Environmental *Acinetobacter baumannii* Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 578–579, 2010.
- GRIBUN, A.; NITZAN, Y.; PECHATNIKOV, I.; HERSHKOVITS, G.; KATCOFF, D. J. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. **Current Microbiology**, v. 47, p. 434–443, 2003.
- GUARDABASSI, L.; PETERSEN, A.; OLSEN, J. E.; DALSGAARD, A. Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n 9, p. 3499–502, 1998.
- GUNDI, V. A. K. B.; DIJKSHOORN, L.; BURIGNAT, S.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species, **Microbiology**, v. 155, p. 2333–2341, 2009.
- GUSATTI, C, S. **Caracterização de isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter* sp.: presença de IS*Aba*1 e diversidade de bla-*oxa*-51-like.** Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011.

HAIN, T. S. **Pesquisa dos genes estruturais *adeB* e *adeC*, e regulatórios *adeR* e *adeS*, do sistema de bomba de efluxo em isolados de *Acinetobacter* sp.** Trabalho de conclusão de curso em Biomedicina, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2013.

HEUER, H.; KRÖGERRECKLENTFORT, E.; WELLINGTON, E. M. H.; Egan, S.; van Elsas, J. D.; van Overbeek, L.; Collard, J-M.; Guillaume, G.; Karagouni, A. D.; Nikolakopoulou, T. L.; Smallaet, K. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. **FEMS microbiology ecology**, v. 42, n. 2, p. 289–302, 2002.

HIGGINS, P. G.; POIREL, L.; LEHMANN, M.; NORDMANN, P.; SEIFERT, H. OXA-143, a novel carbapenemhydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5035-5038, 2009.

HOPKINS, J. M.; TOWNER, K. J. Enhanced resistance to cefotaxime and imipenem associated with outer membrane protein alterations in *Enterobacter aerogenes*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 25, p. 49-55, 1990.

HORREVORTS, A., K. BERGMAN, L. KOLLEE, I. BREUKER, I. TJERNBERG, AND L. DIJKSHOORN. Clinical and epidemiological investigations of *Acinetobacter* genomospecies 3 in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1567–1572, 1995.

HOUANG, E. T.; CHU, Y. W.; LEUNG, C. M.; CHU, K. Y.; BERLAU, J.; NG, K. C.; CHENG, F. B. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 228-234, 2001.

HOWARD, A.; O'DONOGHUE, M.; FEENEY, A.; SLEATOR, R. D. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 243–50, 2012.

HU, W. S.; YAO, S. M.; FUNG, C. P.; HSIEH, Y. P.; LIU, C. P.; LIN, J. F. An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 3844–3852, 2007.

HUJER, K. M.; HAMZA, N. S.; HUJER, A. M.; PEREZ, F.; HELFAND, M. S.; BETHEL, C. R.; THOMSON, J. M.; ANDERSON, V. E.; BARLOW, M.; RICE, L. B.; TENOVER, F. C.; BONOMO, R. A. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2941-2948, 2005.

- IDZENGA, D.; SCHOUTEN, M. A.; VAN ZANTEN, A. R. Outbreak of *Acinetobacter* genomic species 3 in a Dutch intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 63, p. 485-487, 2006.
- JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.
- JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, v. 142, p. 1881-1893, 1996.
- JANSSEN, P.; MAQUELIN, K.; COOPMAN, R.; TJERNBERG, I.; BOUVET, P.; KERSTERS, K.; DIJKSHOORN, L. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, p. 1179-1187, 1997.
- Jaurin, B.; Grundstrom, T. AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamase of the penicillinase type. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 4897-4901, 1981.
- JIN, W.; ARAKAWA, Y.; YASUZAWA, H.; TAKI, T.; HASHIGUCHI, R.; MITSUTANI, K.; SHOGA, A.; YAMAGUCHI, Y.; KUROSAKI, H.; SHIBATA, N.; OHTA, M.; GOTO, M. Comparative study of the Inhibition of Metallo-__-Lactamases (IMP 1 and VIM-2) by Thiol Compounds That Contain a Hydrophobic Group. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 851-856, 2004.
- JOLY-GUILLOU, M. L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 11, p. 868-873, 2005.
- JUNI, E. Genetics and physiology of *Acinetobacter*. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 32, p. 349-371, 1978.
- JYOTHISRI, K.; DEEPAK, V.; RAJESWARI, M. R. Purification and characterization of a major 40 kDa outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. **FEBS Letters**, v. 443, p. 57-60, 1999.
- KANG, Y. S.; JUNG, J.; JEON, C. O.; PARK, W. *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 29-34, 2011.
- KARAH, N.; HALDORSEN, B.; HEGSTAD, K.; SIMONSEN, G. S.; SUNDSFJORD, A.; SAMUELSEN, Ø. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 738-44, 2011.

KEMPF, M.; BAKOUR, S.; FLAUDROPS, C.; BERRAZEG, M.; BRUNEL, J. M.; DRISSI, M.; MESLI, E.; TOUATI, A.; ROLAIN, J. M. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Plos One**, v. 7, n. 2, e31676, 2012.

KIM, C. K.; LEE, Y.; LEE, H.; WOO, G. J.; SONG, W.; KIM, M. N.; LEE, W. G.; JEONG, S. H.; LEE, K.; CHONG, Y. Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter* isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 4, p. 432-438, 2010.

KIM, D.; BAIK, K. S.; KIM, M. S.; PARK, S. C.; KIM, S. S.; RHEE, M. S.; KWAK, Y. S.; SEONG, C. N. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. **The Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 396–401, 2008.

KO, W. C.; LEE, N. Y.; SU, S. C.; DIJKSHOORN, L.; VANEECHOUTTE, M.; WANG, L. R.; YAN, J. J.; CHANGS, T. C. Oligonucleotide array-based identification of species in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex in isolates from blood cultures and antimicrobial susceptibility testing of the isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 2052–2059, 2008.

KRAWCZYK, B.; LEWANDOWSKI, K.; KUR, J. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, p. 1–11, 2002.

LA SCOLA, B.; FOURNIER, P.-E.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. Detection and culture of *Bartonella quintana*, *Serratia marcescens*, and *Acinetobacter* spp. from decontaminated human body lice. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1707–1709, 2001.

LA SCOLA, B.; GUNDI, V. A. K. B.; KHAMIS, A.; RAOULT, D. Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 827–832, 2006.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 1671–1673, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, H. J.; LEE, S. S. *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov., a β glucosidase-producing bacterium, isolated from sewage treatment plant. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 754-759, 2010.

LEE, H. W.; KOH, Y. M.; KIM, J.; LEE, J. C.; LEE, Y. C.; SEOL, S. Y.; CHO, D. T. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology Infection**, v. 14, n. 1, p. 49–54, 2008.

LEE, J. S.; LEE, K. C.; KIM, K. K.; HWANG, I. C.; JANG, C.; KIM, N. G.; YEO, W. H.; KIM, B. S.; YU, Y. M.; AHN, J. S. *Acinetobacter antiviralis* sp. nov., from Tobacco plant roots. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 250–256, 2009.

LEE, Y. T.; KUO, S. C.; CHIANG, M. C.; YANG, S. P.; CHEN, C. P.; CHEN, T. L.; FUNG, C. P. Emergence of carbapenem resistant non-baumannii species of *Acinetobacter* harboring a *bla*_{OXA-51}-like gene that is intrinsic to *A. baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 1124-1127, 2012.

LEE, Y.; KIM, C. K.; LEE, H.; JEONG, S. H.; YONG, D.; LEE, D. A Novel Insertion Sequence, *ISAba10*, Inserted into *ISAba1* Adjacent to the *bla*_{OXA-23} Gene and Disrupting the Outer Membrane Protein Gene *carO* in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 361–363, 2011.

LIM, Y. M.; SHIN, K. S.; KIM, J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 902–905, 2007.

LINTON, K.B.; RICHMOND, M.H.; BEVAN, R.; GILLESPIE, W. A. Antibiotic resistance and R factors in coliform bacilli isolated from hospital and domestic sewage. **Journal of Medical Microbiology**, v. 7, p. 91-103, 1974.

LIVERMORE, D. M. Determinants of the activity of beta-lactamase inhibitor combinations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 31, p. 9-21, 1993.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Carbapenemases: a problem in waiting? **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 489-495, 2000.

LLARRULL, L. I.; TESTERO, S. A.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. The future of the β -lactams. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 551-557, 2010.

LUO, L.; JIANG, X.; WU, Q.; WEI, L.; LI, J.; YING, C. Efflux pump overexpression in conjunction with alternation of outer membrane protein may induce *Acinetobacter baumannii* resistant to imipenem. **Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 77-84, 2011.

MALHOTRA, J.; ANAND, S.; JINDAL, S.; RAMAN, R.; LAL, R. *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from hexachlorocyclohexane (HCH) dumpsite. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 2883–2890, 2012.

MALTEZOU, H. C. Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 5, p. 405- 407, 2009.

MARCHAND, I.; DAMIER-PIOLLE, L.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3298-3304, 2004.

MARCHETTI, D. P. **Presença de bombas de efluxo em isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter* spp.** Trabalho de conclusão de curso em Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

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

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

MISRA, R.; REEVES, P. R. Role of *micF* in the tolC-mediated regulation of OmpF, a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 4722-4730, 1987.

MOLINA, J.; CISNEROS, J. M.; FERNANDEZ-CUENCA, F.; RODRIGUEZ-BANO, J.; RIBERA, A.; BECEIRO, A.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; BOU, G.; VILA, J.; PACHON, J. Clinical features of infections and colonization by *Acinetobacter* genospecies 3. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4623-4626, 2010.

MOREIRA, M. A. S.; OLIVEIRA, J. A.; TEIXEIRA, L. M.; MORAES, C. A. Detection of chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcasses. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p. 75-81, 2005.

MOUBARECK, C.; BREMONT, S.; CONROY, M. C.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. GES 11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3579-3581, 2009.

MUSSI, M. A.; RELING, V. M.; LIMANSKY, A. S.; VIALE, A. M. CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L-ornithine uptake. **FEBS Letters**, v. 581, p. 5573–5578, 2007.

NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L.; CLEENWERCK, I.; DE BAERE, T.; JANSSENS, D.; VAN DER REIJDEN, T. J.; JEZEK, P.; VANEECHOUTTE, M. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1563–1567, 2003.

NEMEC, A.; KRIZOVA, L.; MAIXNEROVA, M.; VAN DER REIJDEN, T. J.; DESCHAGHT, 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). **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 393–404, 2011.

NEMEC, A.; MUSILEK, M.; MAIXNEROVA, M.; DE BAERE, T.; VAN DER REIJDEN, T. J.; VANEECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 118–124, 2009.

NEMEC, A.; MUSILEK, M.; SEDO, O.; DE BAERE, T.; MAIXNEROVA, M.; VAN DER REIJDEN, T. J.; ZDRAHAL, Z.; VANEECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 896–903, 2010.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NIKAIDO, H. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5853-5859, 1996.

NIKAIDO, H. Porins and specific channels of bacterial outer membranes. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 435-442, 1992.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, p. 382-388, 1994.

- NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiological Reviews**, v. 49, n. 1, p. 1-32, 1985.
- NISHIMURA, Y.; INO, T.; IIZUKA, H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n.2 p. 209–211, 1988.
- NITZAN, Y.; DEUTSCH, E. B.; PECHATNIKOV, I. Diffusion of beta-lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. **Current Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 446-455, 2002.
- OBARA, M.; NAKAE, T. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 28, n. 6, p. 791-800, 1991.
- OKUSU, H.; MA, D.; NIKAIDO, H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 306-308, 1996.
- OPAZO, A. C.; MELLA, S. M.; DOMÍNGUEZ, M. Y.; BELLO, H. T.; GONZÁLEZ, G. R. Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. **Revista chilena de infectología**, v. 26, n. 6, p. 499-503, 2009.
- PANTOPHLET, R.; SEVERIN, J. A.; NEMEC, A.; BRADE, L.; DIJKSHOORN, L.; BRADE, H. Identification of *Acinetobacter* isolates from species belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with monoclonal antibodies specific for O Antigens of their lipopolysaccharides. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 1, p. 60-65, 2002.
- PARK, K. H.; SHIN, J. H.; LEE, S. Y.; KIM, S. H.; JANG, M. O.; KANG, S. J.; JUNG, S. I.; CHUNG, E. K.; KO, K. S.; JANG, H. C. The clinical characteristics, carbapenem resistance, and outcome of *Acinetobacter* bacteremia according to genospecies. **Plos One**, v. 8, n. 6, p. e65026, 2013.
- PARK, Y. K.; JUNGB, S. I.; PARKB, K. H.; KIMA, S. H.; KOA, K. S. Characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* other than *Acinetobacter baumannii* in South Korea. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 81–85, 2012.
- PATON, R.; MILES, R. S.; HOOD, J.; AMYES, S. G.; MILES, R. S.; AMYES, S. G. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 2, n. 2, p. 81-87, 1993.
- PELEG, A. Y.; ADAMS, J.; PATERSON, D. L. Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2065-2069, 2007.

PELEG, A. Y.; FRANKLIN, C.; WALTERS, L. J.; BELL, J. M.; SPELMAN, D. W. OXA-58 and IMP-4 Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture isolate from Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 399-400, 2006.

PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.21, n. 3, p. 538–582, 2008.

PETUKHOV, V. N.; FOMCHENKOV, V. M.; CHUGUNOV, V. A.; KHOLODENKO, V. P. Plant biotests of soil and water, polluted with petroleum and petroleum products. **Prikladnaia Biohimiia Mikrobiologiia**, v. 36, p. 652–655, 2000.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G. A. Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 1-11, 2002.

PIDDOCK, L. J. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 629-636, 2006.

POIREL, L.; FIGUEIREDO, S.; CATTOIR, V.; CARATTOLI, A.; NORDMANN, P. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1252-1256, 2008.

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

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 9, p. 826-836, 2006.

PRADO, T.; PEREIRA, W. C.; SILVA, D. M.; SEKI, L. M.; CARVALHO, A. P.; ASENSI, M. D. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 136-141, 2008.

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

RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 2, p. 223-232, 1997.

- ROBLEDO, I. E.; AQUINO, E. E.; SANTE, M. I.; SANTANA, J. L.; OTERO, D. M.; LEON, C. F.; VAZQUEZ, G. J. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1354-1357, 2010.
- RODLOFF, A. C.; GOLDSTEIN, E. J. C.; TORRES, A. Two decades of imipenem therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 916–929, 2006.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M.; NORDMANN, P.; RONCO, E.; POIREL, L. Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3484-3488, 2010.
- ROSSAU, R.; VAN LANDSCHOOT, A.; GILLIS, M.; DE LEY, J. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 2, p. 310–319, 1991.
- RUIZ, M.; MARTI, S.; FERNANDEZ-CUENCA, F.; PASCUAL, A.; VILA, J. Prevalence of IS(*Aba1*) in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, p. 63–66, 2007.
- RUIZ, N.; KAHNE, D.; SILHAVY, T. J. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 57-66, 2006.
- SADER, H. S.; SAMPAIO, J. L. M.; ZOCCOLI, C.; JONES, R. N. Results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program results in three Brazilian medical centers for 1997. **Brazilian Infections Diseases**, v. 3, p. 63–79, 1999.
- SAUVAGE, E.; KERFF, F.; TERRAK, M.; AYALA, J. A.; CHARLIER, P. THE penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 234-258, 2008.
- SEIFERT, H.; BAGINSKI, R.; SCHULZE, A.; PULVERER, G. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 750–753, 1993.
- SEIFERT, H.; DIJKSHOORN, L.; GERNER-SMIDT, P.; PELZER, N.; TJERNBERG, I.; VANEECHOUTTE, M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2819–2825, 1997.
- SEIFERT, H.; GERNER-SMIDT, P. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1402–1407, 1995.

SIMONET, V.; MALLÉA, M.; PAGÈS, J. M. Substitutions in the eyelet region disrupt cefepime diffusion through the *Escherichia coli* OmpF channel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 311–315, 2000.

SINHA, M.; SRINIVASA, H. Mechanisms of resistance to carbapenems in meropenem-resistant *Acinetobacter* isolates from clinical samples. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, p. 121-125, 2007.

SIROY, A.; COSETTE, P.; SEYER, D.; LEMAITRE-GUILLIER, C.; VALLENET, D.; VANDORSSELAER, A.; BOYER-MARIOTTE, S.; JOUENNE, T.; DE, T. E. Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 3385–3398, 2006.

SIROY, A.; MOLLE, V.; LEMAITRE-GUILLIER, C.; VALLENET, D.; PESTEL-CARON, M.; COZZONE, A. J.; JOUENNE, T.; DÉ, E. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 4876-4883, 2005.

SMANI, Y.; PACHÓN, J. Loss of the OprD Homologue Protein in *Acinetobacter baumannii*: Impact on Carbapenem Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 677, 2013.

SMOLYAKOV, R.; BORER, A.; RIESENBERG, K.; SCHLAEFFER, F.; ALKAN, M.; PORATH, A.; RIMAR, D.; ALMOG, Y.; GILAD, J. Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. **Journal of Hospital Infection**, v. 54, p. 32-38, 2003.

SOGAWA, K.; WATANABE, M.; SATO, K. L.; SEGAWA, S.; ISHII, C.; MIYABE, A.; MURATA, S.; SAITO, T.; NOMURA, F. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 1905–1911, 2011.

STACKEBRANDT, E.; EVERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, p. 152-155, 2006.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1043–1047, 2002.

- SU, X.-Z.; CHEN, J.; MIZUSHIMA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. AbeM, an H₂-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 4362–4364, 2005.
- SUGAWARA, E.; NIKAIDO, H. OmpA Is the Principal Nonspecific Slow Porin of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 15, p. 4089-4096, 2012.
- TIAN, G. B.; ADAMS-HADUCH, J. M.; TARACILA, M.; BONOMO, R. A.; WANG, H. N.; DOI, Y. Extended-spectrum AmpC cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC 56 confers resistance to cefepime. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4922-4925, 2011.
- TIWARI, V.; VASHISTT, J.; KAPIL, A.; MOGANTY, R. R. Comparative Proteomics of Inner Membrane Fraction from Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* with a Reference Strain. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p.e39451, 2012.
- TJERNBERG, I.; URSING, J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. **APMIS: Acta pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 97, n. 7, p. 595-605, 1989.
- TOGNIM, M. C.; GALES, A. C.; PENTEADO, A. P.; SILBERT, S.; SADER, H. S. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 7, p. 742-747, 2006.
- TOMÁS, M. M.; BECEIRO, A.; PEREZ, A.; VELASCO, D.; MPOURE, R.; VILLANUEVA, R.; MARTINEZ-BELTRAN, J.; BOU, G. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5172-5175, 2005.
- TOWNER, K. J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 4, p. 355-363, 2009.
- TRAN, Q. T.; MAHENDRAN, K. R.; HAJJAR, E.; CECCARELLI, M.; DAVIN-REGLI, A.; WINTERHALTER, M.; WEINGART, H.; PAGES, J. M. Implication of Porins in β -Lactam Resistance of *Providencia stuartii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 42, p. 32273-32281, 2010.
- TURNER, P. J. Extended-spectrum beta-lactamases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 273-275, 2005.

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

VANEECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; KAMPFER, P.; WAUTERS, G. *Acinetobacter*, *Cryseobacterium*, *Moraxella* and Other Nonfermentative Gram negative Rods. In: **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology - ASM, 10 ed, v. 1, p. 714–738, 2011.

VANEECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L.; TJERNBERG, I.; ELAICHOUNI, A.; DE VOS, P.; CLAEYS, G.; VERSCHRAEGEN, G. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 11–15, 1995.

VANEECHOUTTE, M.; NEMEC, A.; MUSILEK, M.; VAN DER REIJDEN, T. J.; VAN DEN BARSELAAR, M.; TJERNBERG, I.; CALAME, W.; FANI, R.; DE BAERE, T.; DIJKSHOORN, L. Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello et al. 1997 sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1376–1381, 2009.

VASHISTT, J.; TIWARI, V.; KAPIL, A.; RAJESWARI, M. R. Quantitative profiling and identification of outer membrane proteins of beta-lactam resistant strain of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 2, p. 1121–1128, 2010.

VASHISTT, J.; TIWARI, V.; KAPIL, A.; MOGANTY, R. R. Differential expression of outer membrane proteins in early stages of meropenem-resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Integrated Omics**, v. 1, p. 280–286, 2011.

VAZ-MOREIRA, I.; NOVO, A.; HANTSIS-ZACHAROV, E.; LOPES, A. R.; GOMILA, M.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M.; HALPERN, M. *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2837–2843, 2011.

VILA, J.; MARTI, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 1210–1215, 2007.

VIVEIROS, M.; DUPONT, M.; RODRIGUES, L.; COUTO, I.; DAVIN-REGLI, A.; MARTINS, M.; PAGÈS, J. M.; AMARAL, L. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. **Plos One**, v. 2, n. 4, p. e365, 2007.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE, L.T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407–4414, 1995.

- WALSH, T. R.; BOLMSTROM, A.; QWARNSTROM, A.; GALES, A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2755–2759, 2002.
- WALSH, T. R.; TOLEMAN, M. A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.
- WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 373-383, 2006.
- WISPLINGHOFF, H.; SCHMITT, R.; WÖHRMANN, A.; STEFANIK, D.; SEIFERT, H. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Hospital Infection**, v. 66, n. 2, p. 174–181, 2007.
- WONG, E. W.; YUSOF, M. Y.; MANSOR, M. B.; ANBAZHAGAN, D.; ONG, S. Y.; SEKARAN, S. D. Disruption of *adeB* gene has a greater effect on resistance to meropenems than *adeA* gene in *Acinetobacter* spp. isolated from University Malaya Medical Centre. **Singapore Medical Journal**, v. 50, n. 8, p. 822-826, 2009.
- YAMAMOTO, S.; BOUVET, P. J.; HARAYAMA, S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. **International journal of systematic bacteriology**, v. 49, p. 87–95, 1999.
- YOON, J. H.; KIM, I. G.; OH, T. K. *Acinetobacter marinus* sp. nov. and *Acinetobacter seohaensis* sp. nov., isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 11, p. 1743–1750, 2007.
- YUN, S. H.; CHOI, C. W.; KWON, S. O.; PARK, G. W.; CHO, K.; KWON, K. H.; KIM, J. Y.; YOO, J. S.; LEE, J. C.; CHOI, J. S.; KIM, S.; KIM, S. I. Quantitative Proteomic Analysis of Cell Wall and Plasma Membrane Fractions from Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 2, p. 459-469, 2011.
- ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C.; VERNET, T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 361-385, 2008.

ZEANA, C.; LARSON, E.; SAHNI, J.; BAYUGA, S. J.; WU, F.; DELLA-LATTA, P. The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: does the community represent a reservoir? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 24, n. 4, p. 275-279, 2003.

ZHANG, C.; QIU, S.; WANG, Y.; Qi, L.; HAO, R.; Liu, X.; Shi, Y.; Hu, X.; An, D.; Li, Z.; LI, P.; WANG, L.; CUI, J.; WANG, P.; HUANG, L.; KLENA, J. D.; SONG, H. Higher isolation of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* from the sewage of the hospitals in Beijing. **Plos One**, v. 8, n. 6, p. e64857, 2013.

8. ANEXOS

8.1 Meios de cultura

Caldo BHI (Brain Heart Infusion)

Infusão de cérebro de vitelo – 200 g

Infusão de coração bovino – 250 g

Peptona proteose – 10 g

Dextrose – 2,0 g

Cloreto de sódio – 5,0 g

Fosfato dissódico – 2,5 g

Água destilada – 1000 mL

Ágar TSA (Agar Triptona de Soja)

Hidrolisado enzimático de caseína – 15 g

Peptona de soja – 5 g

Cloreto de sódio – 5 g

Ágr – 15 g

Água destilada – 1000 mL

8.2 Soluções para eletroforese em gel de agarose

TAE 50X

Tris base – 242 g

Ácido acético glacial – 57,1 mL

EDTA (0,5M, pH 8,0) – 100 mL

Água destilada – 715,1 mL

TAE 1X

TAE 50X – 20 mL

Água destilada – 980 mL

Gel de agarose 1%

Agarose – 1 g

TAE 1X – 100 mL

Solução de brometo de etídeo

Brometo de etídeo – 10 mg/mL

Água destilada esterilizada – 1 mL

Solução estoque, manter a 4°C.

Tampão de corrida 6X

Azul de bromofenol – 0,5 g

Glicerol – 30 mL

Água destilada – 70 mL

Ajustar o pH com NaOH (1M) até obter uma coloração azul escura.

Armazenar a -20°C.

8.3 Soluções para SDS-PAGE**Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%**

SDS – 10 g

Água destilada – 100 mL

Estocar a temperatura ambiente.

Solução persulfato de amônio (APS) 10%

Persulfato de amônio – 1 g

Água destilada esterilizada – 100 mL

Aliquotar e manter a -20°C.

Tampão estoque tris-glicina (4X)

Tris base – 12 g

Glicina – 57,6 g

Água destilada – 1000 mL

Estocar a 4°C.

Solução de uso tampão tris-glicina

Água deionizada – 370 mL

Tampão estoque tri-glicina 4X – 125 mL

SDS 10% - 5 mL

Solução de acrilamida 30%

Acrilamida – 30 g

N'N'-bis-metileno-acrilamida – 0,8 g

Água deionizada – 100 mL

Armazenar em frasco escuro a 4°C.

Tampão do gel de resolução 4X

Tris base – 18,17 g

SDS 10% - 4 mL

Água destilada – 100 mL

Ajustar o pH para 8,8 com HCl. Estocar a 4°C.

Tampão do gel de concentração (4X)

Tris base – 6,06 g

SDS 10% - 4 mL

Água destilada – 100 mL

Ajustar o pH para 6,8 com HCl. Estocar a 4°C.

Solução de poliacrilamida 5% (gel de concentração)

Água destilada – 1,4 mL

Solução de acrilamida 30% - 0,33 mL

Tris (1M, pH 6,8) – 0,25 mL

SDS 10% – 0,02 mL

APS 10% – 0,02 mL

TEMED – 0,002 mL

Solução de poliacrilamida 15% (gel de resolução)

Água destilada – 2,3 mL

Solução de acrilamida 30% - 5 mL

Tris (1,5M, pH 8,8) – 2,5 mL

SDS 10% – 0,1 mL

APS 10% – 0,1 mL

TEMED – 0,004 mL

Tampão de amostra (5X)

Água deionizada – 3,9 mL

Tris (0,5M, pH6,8) – 1 mL

Glicerol – 0,8 mL

SDS 10% - 1,6 mL

2-mercaptoetanol – 0,4 mL

Azul de bromofenol 1% - 0,4 mL

Estocar no freezer.

Solução corante

Metanol – 400 mL

Ácido acético glacial – 100 mL

Água destilada – 500 mL

Coomassie blue R-250 – 1 g

Solução descorante

Metanol – 400 mL

Ácido acético glacial – 100 mL

Água destilada – 500 mL