

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

Caracterização molecular e detecção de genes de
resistência em isolados de *Acinetobacter* spp. de
amostras clínicas e de efluente hospitalar

Alessandra Einsfeld Ferreira

Orientador: Dra. Gertrudes Corção

Julho, 2010.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

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

Caracterização molecular e detecção de genes de
resistência em isolados de *Acinetobacter* spp. de
amostras clínicas e de efluente hospitalar

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente (Área de concentração:
Microbiologia Molecular de Procariotos e
Eucariotos), da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como requisito parcial
para a obtenção do grau de doutor em
Microbiologia.

Alessandra Einsfeld Ferreira

Bióloga (PUCRS)

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (UFRGS)

Orientador: Dra. Gertrudes Corção

AGRADECIMENTOS

Ao Hospital São Lucas da PUCRS, Complexo Hospitalar Conceição e Hospital de Clínicas de Porto Alegre por disponibilizarem os isolados clínicos utilizados neste trabalho e por autorizarem as coletas de efluente hospitalar.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente que contribuíram para minha formação.

À minha orientadora Dr. Gertrudes Corção por todos estes anos de convívio, dedicação e muito aprendizado.

Aos colegas do Laboratório 166 Natalia Canal, Daiane Fuentefria, Carolina Gusatti, Gabriela da Rosa, Giuliano Hickenbick, Letícia Otton, Waldir Henkes pelas contribuições, por muitas vezes colocarem e tirarem os PCRs e pela amizade.

Um agradecimento muito especial as minhas estagiárias e a migas Desireé Marchetti e Lyvia Moreira de Oliveira pela dedicação que tiveram com este trabalho, pelos momentos maravilhosos que passamos juntas nestes anos e por muitos almoços maravilhosos.

À minha família e aos meus amigos por compreenderem minha ausência, pelo apoio e especialmente para minha maior incentivadora, minha vó Regina.

Ao meu marido Juliano Romanzini tenho que agradecer por todo o amor, toda a compreensão, paciência e todo o apoio durante os quatro intermináveis anos de doutorado, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Caracterização molecular e detecção de genes de resistência em isolados de *Acinetobacter* spp. de amostras clínicas e de efluente hospitalar

Autor: Alessandra Einsfeld Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Gertrudes Corção

¹RESUMO

O gênero *Acinetobacter* tem emergido como um importante patógeno nosocomial que apresenta, não apenas resistência intrínseca a muitos antimicrobianos, como também uma grande habilidade de adquirir novos mecanismos de resistência. É de grande importância o conhecimento da epidemiologia local dos isolados para que se possa estabelecer o melhor tratamento a ser adotado e as medidas de controle epidemiológico mais adequadas para evitar a disseminação destes microrganismos. O objetivo deste trabalho foi de comparar isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes de amostras clínicas e de efluente hospitalar quanto ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e a presença de genes de resistência aos carbapenêmicos, assim como determinar a relação clonal destes isolados. Para isso isolados clínicos e amostras de efluente hospitalar de cinco hospitais em Porto Alegre, RS, Brasil foram coletadas. Os isolados bacterianos foram identificados como pertencentes ao gênero *Acinetobacter* através da amplificação do rDNA16S. O perfil de suscetibilidade a antimicrobianos foi avaliado pela técnica de disco-difusão e a presença dos genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-51}* foi analisada por PCR em todos os isolados resistentes a carbapenêmicos. A relação clonal dos isolados foi avaliada pela amplificação de seqüências repetitivas do genoma (ERIC-PCR) e a análise de macrorestrição do genoma (PFGE). Foram analisados 577 isolados, sendo 274 clínicos e 303 de efluente hospitalar. Foram encontrados 68% de isolados clínicos e 30% de isolados de efluente multirresistentes. Não foram identificados isolados com genes para metalo-β-lactamases, mas 61,2% dos isolados clínicos e três isolados de efluente hospitalar apresentaram o gene *bla_{OXA-23}*. O gene *bla_{OXA-51}* foi identificado em 84% dos isolados clínicos e 56% de efluente. As técnicas de ERIC-PCR e PFGE indicaram uma disseminação de isolados clones entre os diferentes hospitais analisados, assim como uma similaridade genética entre isolados de efluente hospitalar e isolados clínicos, indicando a disseminação dos últimos através do efluente.

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Molecular de Procariotos e Eucariotos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (130p). Julho, 2010.

Molecular characterization and detection of resistance genes in isolates of *Acinetobacter* spp. from clinical specimens and hospital wastewater

Author: Alessandra Einsfeld Ferreira

Advisor: Prof. Dr. Gertrudes Corção

²ABSTRACT

The genus *Acinetobacter* has emerged as an important nosocomial pathogen that presents not only intrinsic resistance to many antibiotics, but also a great ability to acquire new resistance mechanisms. It is very important to study local epidemiology of bacterial isolates so the best treatment and the most appropriate epidemic control measurements to prevent the spread of these microorganisms can be determined. The aim of this study was to compare isolates of *Acinetobacter* spp. from clinical specimens and hospital wastewater on their antibiotic susceptibility profile and the presence of resistance genes to carbapenems, as well as to determine the clonal relationship of these isolates. Clinical isolates and hospital wastewater samples from five hospitals in Porto Alegre, RS, Brazil were collected. The isolates were identified as belonging to the genus *Acinetobacter* by amplification of the rDNA16S. The susceptibility profile was determined by the disk-diffusion method and the presence of the *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} genes were screened by PCR. The clonal relationship of the isolates was evaluated by amplification of repetitive sequences from the genome (ERIC-PCR) and macrorestriction analysis of the genome (PFGE). We analyzed 577 isolates, where 274 were of clinical origin and 303 from the hospital wastewater samples. We found that 68% of the clinical isolates and 30% of the wastewater isolates were multiresistant. None of the isolates presented genes of metallo- β -lactamase, in other hand, 61.2% of the clinical isolates and three from the hospital wastewater had the gene *bla*_{OXA-23}. The gene *bla*_{OXA-51} was identified in 84% of the clinical isolates and in 56% of the hospital wastewater ones. The PFGE and ERIC-PCR analysis showed a possible dissemination of clones strains among the hospitals studied, and a genetic similarity among the hospital sewage and clinical isolates, indicating their dissemination through the wastewater.

2 Doctoral thesis in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (130p). July, 2010.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	vii
RELAÇÃO DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 O gênero <i>Acinetobacter</i>	4
2.2 Mecanismos de Resistência	9
2.3 β -lactamases	12
2.3.1 Metallo- β -lactamases	13
2.3.2 Oxacilinases	15
2.4 Resistência a antimicrobianos no ambiente e efluente hospitalar	19
2.5 Tipificação de <i>Acinetobacter</i> spp.	23
2.5.1 Amplificação de Sequências Intergênicas Repetidas de Enterobactérias (ERIC-PCR)	23
2.5.2 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	25
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS	27
3.1 ARTIGO 1: Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em cepas de <i>Acinetobacter</i> spp. isoladas de efluente hospitalar em Porto Alegre-RS.	27
3.2 ARTIGO 2: Presence of OXA-23-producing isolates of <i>Acinetobacter baumannii</i> in wastewater from hospitals in southern Brazil.	34
3.3 ARTIGO 3: Caracterização molecular de isolados clínicos de <i>Acinetobacter</i> sp. multirresistentes em hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil.	56
3.4 ARTIGO 4: Disseminação de <i>Acinetobacter</i> spp. multirresistente carreadores do gene <i>bla</i> _{OXA-23} em hospitais e efluentes hospitalares em Porto Alegre, RS, Brasil.	79
4. DISCUSSÃO GERAL	102
5. CONCLUSÕES	110
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
7. VITA	120

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1	Espécies pertencentes ao gênero <i>Acinetobacter</i> segundo Hanlon (2005).	7
TABELA 2	Sub-grupos de β -lactamases da família OXA carbapenemase.	17
TABELA 1	Artigo 1 - Características dos hospitais estudados.	29
TABELA 2	Artigo 1 - Áreas dos hospitais correspondentes aos pontos de coleta analisados.	29
TABELA 1	Artigo 2 - Primers used in the present study for detection of resistant genes of classes B and D of Ambler.	52
TABELA 2	Artigo 2 - Prevalence of resistance to multiple antibiotics in <i>Acinetobacter</i> spp. isolated from the wastewater of three hospitals in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.	53
TABELA 3	Artigo 2 - Percentage of susceptibility to antimicrobials of <i>Acinetobacter</i> spp. isolated from samples of wastewater from three hospitals in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.	54
TABELA 1	Artigo 3 - <i>Primers</i> utilizados neste estudo para detecção dos genes de resistência das classes B e D de Ambler.	64
TABELA 2	Artigo 3 - Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nos 5 hospitais avaliados, com o número de isolados identificados para cada perfil em cada hospital.	67
TABELA 1	Artigo 4 - Tabela 1 – Grupos formados pela tipificação molecular de isolados clínicos e de efluente hospitalar de <i>Acinetobacter</i> spp. utilizando as técnicas de PFGE e ERIC-PCR. Os isolados em negrito correspondem aos isolados de cada grupo formado no ERIC-PCR que foi utilizado na técnica de PFGE.	99
TABELA 3	Descrição dos isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. utilizados neste trabalho quanto ao período de coleta, origem e número de isolados analisados de cada hospital.	103

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1	Artigo 1 - Perfil de sensibilidade a antibióticos encontrado para os isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. do efluente dos hospitais A e B de Porto Alegre – RS.	31
FIGURA 2	Artigo 1 - Perfil de sensibilidade a antibióticos encontrado para os isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. do efluente dos pontos B, C, D e G do hospital II.	32
FIGURA 1	Artigo 2 - Comparison among the resistance profile of <i>Ac. baumannii</i> and <i>Acinetobacter</i> spp isolated from wastewater samples of Porto Alegre/RS hospitals.	55
FIGURA 1	Artigo 3 - Gráfico indicando a porcentagem correspondente a cada material biológico utilizado para isolamento de <i>Acinetobacter</i> sp. em cada hospital estudado (A, B, C e D).	66
FIGURA 1	Artigo 4 - Figura 1 – Perfis obtidos para os isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. utilizando a técnica de PFGE. Canaletas: 1-marcador molecular DNA Ladder 100; 2- Perfil I; 3- Perfil II; 4- Perfil XI; 5- Perfil X; 6- Perfil IX; 7- Perfil IV; 8- Perfil XIII; 9-Perfil XIV; 10- Perfil XII; 11- Perfil Ia; 12- Perfil V, 13- Perfil III, 14- Perfil VII; 15- Perfil VIII e 16- Perfil VI.	100
FIGURA 2	Artigo 4 - Figura 2 – Dendograma de PFGE com os isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. dos diferentes grupos clonais obtidos pela técnica de ERIC-PCR, demonstrando os 15 perfis encontrados. O dendograma foi obtido através do método de agrupamento usando média aritmética não-ponderada (UPGMA). A similaridade genética indicada no dendograma foi calculada pelo coeficiente de Dice e o ponto de corte de 80% de similaridade foi utilizado para definição dos grupos clonais. I a XIII representam cada um dos grupos clonais obtidos.	101

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2MPA	Ácido 2-mercaptopropiônico
%	porcentagem
°	grau
°C	grau Celsius
Ami	amicacina (30µg)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Atm	aztreonam (30µg)
Caz	ceftazidima (30µg)
CHEF	<i>Contor-clamped homogeneous electric field</i>
Cip	ciprofloxacina (50µg)
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
Cpm	cefepime (30µg)
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
ERIC	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
ESBL	β-lactamase de espectro estendido
Etest	<i>Episilometer test</i>
G	grama
Gen	gentamicina (10µg)
Imp	Imipenem (10µg)
Kb	Kilobase
L	litro
M	molar
MBL	metalo-β-lactamase
Mer	Meropenem (10µg)
Mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MIC	<i>Minimal Inibitory Concentration</i>
mL	<i>millilitro</i>
mM	<i>milimolar</i>
Ng	<i>nanograma</i>
Pb	<i>pares de bases</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
Ppt	piperacilina-tazobactam (100µg/10µg)
REP	<i>repetitive enterobacterial palindromic</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
Tic	ticarcilina-ácido clavulânico (75µg/10µg)
Tris	tris(hidroximetil) aminometano
UPGMA	<i>Unweighted pair-group method with average linkages</i>
V	volt
β	beta
µg	micrograma
µL	microlitro

1. INTRODUÇÃO

Tem se observado ao longo dos anos, um aumento na resistência aos antimicrobianos entre as bactérias patogênicas que causam doenças em humanos e bactérias que antes apresentavam questionável patogenicidade e agora tornaram-se um importante agente causador de infecções no mundo. O gênero *Acinetobacter* é um exemplo destas bactérias, pois tem causado surtos de infecções em hospitais de todo o mundo. Uma característica importante destas infecções é ser causada por cepas resistentes a maioria dos antimicrobianos utilizados na rotina, incluindo carbapenêmicos, tornando difícil seu tratamento.

Algumas espécies de *Acinetobacter* podem estar presentes na pele humana, podendo causar Infecções Associadas à Assistência à Saúde (IAAS) em indivíduos debilitados, como queimados, crianças e pacientes em Unidades de Tratamento Intensivo, mas normalmente não são considerados patogênicos em pessoas saudáveis. Este gênero apresenta uma ampla distribuição no ambiente sendo encontrado na água, no solo e eventualmente em alimentos; tem a capacidade de crescer em amplas faixas de pH e temperatura e permanece em ambiente aquático por longos períodos. Ele

também apresenta grande habilidade de desenvolver resistência a agentes antimicrobianos. Por apresentar estas características, este gênero pode ser um ótimo indicador para o monitoramento da resistência bacteriana em ambientes aquáticos.

Estudos têm demonstrado que efluentes hospitalares descartam nos corpos de água antimicrobianos e bactérias resistentes a antimicrobianos em grandes quantidades. Além de antimicrobianos, outras substâncias químicas, como metais pesados e detergentes, também são lançadas diariamente nos corpos de água através do efluente das grandes cidades, sem nenhum tratamento prévio. Estas substâncias e microrganismos resistentes a antimicrobianos quando presentes em corpos de água, além de causar danos ecológicos ao meio ambiente, contribuem para a evolução, seleção e dispersão de genes de resistência.

No ambiente aquático, bactérias de diferentes origens, como de animais, humanos e do próprio ambiente se misturam. As bactérias do ambiente, principalmente do solo, apresentam diversos genes de resistência, assim como mecanismos de resistência a estes antimicrobianos. A presença de antimicrobianos na água, assim como outras substâncias, criam neste ambiente uma pressão seletiva, podendo transformar os corpos de água em reservatórios de genes de resistência e também em disseminadores de microrganismos resistentes.

O gênero *Acinetobacter* apresenta vários mecanismos de resistência aos antimicrobianos, sendo as β -lactamases, o mecanismo mais comum. A resistência a β -lactamases devido à produção de enzimas do tipo metalo- β -lactamases e oxacilinases causam maior preocupação, pois os genes para

produção destas enzimas residem em regiões móveis do DNA bacteriano, tornando estes genes potencialmente transferíveis entre microrganismos da mesma espécie ou para outras espécies.

Muitos estudos têm sido realizados com amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. para determinar os mecanismos de resistência, assim como a tipificação dos isolados para avaliar sua disseminação clonal dentro dos hospitais. Porém, poucos estudos têm sido realizados com amostras de efluente e do próprio ambiente para avaliar a resistência à antimicrobianos destes microrganismos e possíveis relações genéticas com as cepas clínicas.

O objetivo geral deste estudo é comparar isolados de *Acinetobacter* spp. provenientes de amostras clínicas e de efluente hospitalar quanto ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e a presença de genes de resistência aos carbapenêmicos, assim como determinar a relação clonal destes isolados.

Como objetivos específicos:

- 1) caracterizar os isolados do efluente hospitalar e de amostras clínicas quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos;
- 2) verificar a presença de genes para a produção de metalo- β -lactamases em isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes a carbapenêmicos;
- 3) verificar a presença de genes para a produção de oxacilinases em isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes a carbapenêmicos;
- 4) avaliar a disseminação clonal de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. que apresentam o gene *bla*_{OXA-23}, entre os hospitais estudados;
- 5) avaliar a disseminação clonal de isolados de *Acinetobacter* spp., que apresentam o gene *bla*_{OXA-23} em amostras de efluente hospitalar.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 O gênero *Acinetobacter*

O gênero *Acinetobacter* foi originalmente proposto por Brison e Prévot (1954), é composto por bactérias não móveis, Gram-negativas, estritamente aeróbicas e apresentam um conteúdo de G+C de 39-47% em seu DNA genômico (Janssen *et al.*, 1997; Misbah *et al.*, 2005). Durante a fase logarítmica de crescimento, apresentam a forma de bacilos, caracterizando-se pela ocorrência aos pares. Na fase estacionária, as células se apresentam na forma de cocobacilos, ocorrendo sozinhos ou aos pares. São oxidase-negativa e catalase-positivo; não produzem esporos e não apresentam pigmentos. São capazes de crescer em meio mineral com acetato como única fonte de carbono e com amônia ou nitrato como fonte de nitrogênio. Muitas cepas podem utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono, incluindo compostos aromáticos, açúcares pentose, álcoois e aminoácidos. São incapazes de utilizar metanol, glicerol, dissacarídeos e polissacarídeos. Muitas cepas produzem lipases e poucas hidrolizam gelatina (Baumann *et al.*, 1968).

Este gênero foi colocado inicialmente na família Neisseriaceae, mas estudos de hibridização DNA-RNA e análises filogenéticas baseadas nas seqüências 16S rRNA mostraram claramente que *Acinetobacter* pertence à subclasse γ da Classe Proteobacteria (Janssen *et al.*, 1997). Posteriormente, Rossau *et al.* (1991) propuseram colocar o gênero *Acinetobacter* na família Moraxelaceae.

O gênero *Acinetobacter* tem ampla distribuição na natureza. São organismos endógenos de vários tipos de solo e água, sendo ocasionalmente encontrados em alimentos (Baumann, 1968; Bifulco *et al.*, 1989). Embora eles sejam habitantes normais da pele humana e sejam capazes de colonizações transitórias do trato respiratório superior, são usualmente considerados não patogênicos em pessoas saudáveis (Janssen *et al.*, 1997).

Nos últimos anos, membros deste grupo, em particular *Acinetobacter baumannii*, tem sido associados com Infecções Associadas à Assistência à Saúde (IAAS) oportunistas principalmente em pacientes imunocomprometidos. Os pacientes em unidades de tratamento intensivo são os de maior risco, assim como os queimados. Os principais locais de infecção são o trato respiratório, principalmente associado a utilização de ventilação mecânica, trato urinário, circulação sanguínea, feridas e queimaduras (Karlowsky *et al.*, 2003).

Na revisão do gênero *Acinetobacter* realizada por Hanlon (2005) dezessete espécies genômicas foram designadas através de nomes, enquanto que as outras são designadas por números (Tabela 1). Os testes bioquímicos tradicionais baseiam-se em características fenotípicas, a identificação em nível de espécie é bastante complexa. Bouvet e Grimont em 1986 descreveram um sistema com mais de 20 testes distintos para identificação das espécies de

Acinetobacter, porém esta metodologia é pouco utilizada por ser muito trabalhosa e não identificar de forma eficiente algumas espécies deste gênero, como as espécies *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* e as espécies genômicas 3 e 13TU. Estas espécies são difíceis de distinguir fenotipicamente e geneticamente e, por esta razão, recebem o nome de complexo *A. baumannii*-*A. calcoaceticus*.

A. calcoaceticus é considerado um microrganismo de solo, enquanto que as outras três espécies são as mais associadas a infecções adquiridas em hospitais (Henwood *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2005). A espécie *A. baumannii*, em particular, é a mais isolada de pacientes com Infecções Associadas à Assistência à Saúde (IAAS) e tem sido atribuída como causa de aproximadamente 43% da mortalidade de pacientes com bacteremia, segundo estudo realizado por Misbah *et al.* (2005).

A ecologia e epidemiologia das espécies de *Acinetobacter* não são bem compreendidas devido à falta de métodos práticos e rápidos de identificação destes microrganismos. O uso de métodos bioquímicos e *kits* de identificação vendidos comercialmente para a identificação das espécies de *Acinetobacter* não são satisfatórios. Muitos destes procedimentos tradicionais não apresentam bons resultados, pois têm baixo poder discriminatório e baixa reprodutibilidade (Bouvet e Grimont, 1987; Seifert e Gerner-Smidt, 1995). Vários métodos de tipificação têm sido empregados em investigações epidemiológicas das espécies deste gênero.

Tabela 1 – Espécies pertencentes ao gênero *Acinetobacter* segundo Hanlon (2005).

Nome da espécie	Nome anterior	Genoespécie	Cepa tipo
<i>A. baumannii</i>	<i>Bacterium anitratum</i>	2	NCTC 12156
<i>A. baylyi</i>	-	-	CIP 107474
<i>A. bouvetii</i>	-	-	CIP 107468
<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Moraxella calcoacetica</i>	1	NCTC 12983
<i>A. gernerii</i>	-	-	CIP 107464
<i>A. grimontii</i>	-	-	CIP 107470
<i>A. haemolyticus</i>	<i>Achromobacter haemolyticus</i>	4	NCTC 10305
<i>A. johnsonii</i>	<i>Achromobacter metalcaligenes</i>	7	NCTC 10308
<i>A. junii</i>	<i>Achromobacter citrocaligenes</i>	5	NCTC 10307
<i>A. lwoffii</i>	<i>Moraxella lwoffii</i>	8	NCTC 5866
<i>A. parvus</i>	-	-	CIP 108168
<i>A. radioresistens</i>	-	12	NCIMB 12753
<i>A. schindleri</i>	-	-	CIP 107287
<i>A. tandoii</i>	-	-	CIP 107469
<i>A. tjernbergiae</i>	-	-	CIP107465
<i>A. townneri</i>	-	-	CIP 107472
<i>A. ursingii</i>	-	-	CIP 107286
Sem nome	<i>Herellea vaginicola</i>	3	NCIMB 9017
Sem nome	<i>Moraxella glucidolytica</i>	6	ATCC 17979
Sem nome	<i>Mima polymorpha</i>	9	ATCC 9957
Sem nome	<i>Achromobacter anitrata</i>	10	NCIMB 9019
Sem nome	-	11	NCIMB 8250
Sem nome	<i>Achromobacter conjunctivae</i>	13	NCTC 10304
Sem nome	<i>Achromobacter anitratus</i>	13TU	NCTC 8102
Sem nome	-	14	Bouvet 382
Sem nome	-	15	Bouvet 79
Sem nome	-	15TU	Tjernberg 151 ^a
Sem nome	<i>Alcaligenes haemolyticus</i>	16	ATCC 17988
Sem nome	-	17	Bouvet 942

Estes métodos utilizam variações das propriedades fenotípicas tais como suscetibilidade a antimicrobianos, sorotipos, tipos de fagos e perfil de proteínas da parede celular.

Pela dificuldade das técnicas fenotípicas, as moleculares têm sido propostas para facilitar a identificação destes microrganismos (Hanlon, 2005), principalmente das espécies pertencentes ao complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (Chang *et al.*, 2005). Métodos utilizados para identificação em nível de espécie incluem DNA-DNA hibridização, análise de restrição (ARDRA), análise de restrição DNA ribossomal, análise do gene 16S e AFLP (*amplified-fragment length polymorphism*) (Hanlon, 2005; Seifert *et al.*, 2005).

As análises de amplificação do gene 16S rRNA ou amplificação do rDNA e análise de restrição (ARDRA) têm-se mostrado eficientes para utilização na identificação de espécies de diferentes gêneros (Vanechoutte *et al.*, 1995). Vanechoutte *et al.* (1995) utilizou a técnica de ARDRA com 10 enzimas diferentes e concluiu que esta técnica pode ser uma alternativa rápida e prática para a identificação das espécies de *Acinetobacter* de diferentes amostras ambientais e clínicas. Com cinco enzimas foi possível identificar 20 grupos deste gênero e a espécie mais freqüente *A. baumannii*, pode ser identificada com a utilização de três enzimas.

Entre as técnicas moleculares testadas, AFLP também tem apresentado algumas vantagens quando comparada com outras técnicas, incluindo um bom poder discriminatório, reprodutibilidade e produção de bandas claras para análise em computador (Vanechoutte *et al.*, 1995; Koeleman *et al.*, 1998 e Nemeč *et al.*, 2001).

Ibrahim *et al.* (1997) analisando 21 cepas de *Acinetobacter* representando a maioria das espécies, demonstrou que a técnica de seqüenciamento do gene 16S rDNA é uma técnica rápida e eficiente para a identificação das espécies deste gênero.

2.2 Mecanismos de resistência

Uma importante característica das infecções por *Acinetobacter* spp. é sua resistência à maioria dos antimicrobianos utilizados na rotina, tornando difícil o tratamento destas infecções. Desde 1970, isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. têm demonstrado um aumento na resistência a antimicrobianos. Inicialmente, demonstrou-se a aquisição de resistência a aminopenicilinas, ureidopenicilinas, primeira e segunda geração de cefalosporinas, cefamicinas, aminoglicosídeos, clorafenicol e tetraciclina (Abbo *et al.*, 2005). *A. baumannii* agora apresenta resistência a muitas classes de antimicrobianos, ou intrinsecamente ou através da aquisição de fatores genéticos de resistência. Mais recentemente, tem aumentado a preocupação com isolados de *Acinetobacter* spp. que apresentam resistência aos carbapenêmicos, particularmente ao imipenem (Sinhá e Srinivasa, 2007).

Cepas resistentes a carbapenêmicos representam um sério problema, pois estes antimicrobianos são considerados como um dos últimos recursos para o tratamento de infecções por bacilos Gram-negativos multirresistentes (Walsh *et al.*, 2002). Para o tratamento de infecções causadas por espécies de *Acinetobacter* resistentes a carbapenêmicos, restam apenas agentes antimicrobianos como ampicilina-sulbactam, ao qual muitos isolados já

apresentam resistência, ou tratamentos potencialmente mais tóxicos como, por exemplo, a polimixina (Gales *et al.*, 2003).

Segundo trabalho realizado por Jawad *et al.* (1998), isolados do gênero *Acinetobacter* podem sobreviver ao dessecamento por períodos prolongados. Esta característica os torna capazes de permanecer na pele de pacientes, de enfermeiros e médicos assim como em objetos utilizados no ambiente hospitalar por longos períodos, aumentando a incidência de infecções. A sobrevivência destas espécies também se deve à habilidade das mesmas em crescer em ampla faixa de pH e temperatura, tornando este gênero com características únicas entre as bactérias nosocomiais Gram-negativas, que também favorecem sua persistência em ambiente hospitalar (Bergogne-Berezin e Towner, 1996).

A formação de biofilmes é uma ótima estratégia destes microrganismos para sobreviver em condições adversas, durante a invasão em um hospedeiro ou durante um tratamento com antimicrobianos, tornando-se uma importante característica de patogenicidade (Lee *et al.*, 2008). Além disso, as células bacterianas apresentam a habilidade de transferência horizontal de genes, facilitando a dispersão de genes de resistência (Donlan e Costerton, 2002). Alguns trabalhos já demonstraram a capacidade de *A. baumannii* em formar biofilmes (Tomaras *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008).

A contaminação do ambiente hospitalar tem sido apontado como um importante fator na permanência de isolados de *Acinetobacter* spp. no hospital assim como na sua disseminação (Denton *et al.*, 2005). Isolados deste gênero foram identificados em equipamentos hospitalares, principalmente do ambiente próximo ao paciente como as grades da cama, mesa de refeição, aparelhos de

ventilação mecânica, válvulas de oxigênio entre outros (Maragakis e Perl, 2008).

Acinetobacter spp. durante as últimas três décadas, tem emergido de um microrganismo de questionável patogenicidade para um importante agente causador de infecções no mundo. Infecção por este gênero tem sido clinicamente predominante em países tropicais, tem causado recorrentes problemas em guerras e em desastres naturais e tem sido responsável por surtos em vários hospitais de climas temperados. O surgimento de isolados resistentes a todos os antimicrobianos disponíveis comercialmente, com a habilidade de acumular diversos mecanismos de resistência e a falta de desenvolvimento de novos antimicrobianos, são fatores que têm causado preocupação (Munoz-Price *et al.*, 2008).

Alguns fatores podem favorecer a aquisição de multirresistência: um é a habilidade de sobreviver no ambiente e em reservatório humano, o segundo é a aquisição de elementos genéticos, como plasmídeos, transposons e integrons e o terceiro fator é a resistência intrínseca destes microrganismos (Vila *et al.*, 2007).

No gênero *Acinetobacter* a resistência a carbapenêmicos esta associado a uma variedade de mecanismos combinados, incluindo aquisição de β -lactamases, desrepressão estável de AmpC, diminuição da permeabilidade, alteração das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), e menos comuns, superexpressão de bombas de efluxo.

O mecanismo mais comum de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos é a presença de β -lactamases, que são codificadas pelo cromossomo ou carregadas por plasmídeos ou transposons. Maior atenção

tem sido destinada ao surgimento de isolados resistentes a carbapenêmicos pela aquisição de β -lactamases, como as metalo- β -lactamases ou oxacilinases, sendo a segunda as mais freqüentes no gênero *Acinetobacter* (Turton *et al.*, 2004).

2.3 β -lactamases

O meio mais comum de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos é a síntese de β -lactamases, enzimas que inativam os antimicrobianos β -lactâmicos pela quebra do anel β -lactâmico.

A classificação das β -lactamases pode ser definida de acordo com duas propriedades, funcional e molecular. Pela classificação de Bush *et al.* (1995) as β -lactamases são divididas em 3 grupos de enzimas com base no seu substrato e perfis de inibição: sendo o grupo 1 das cefalosporinases que são bem inibidas por ácido clavulânico; grupo 2 das penicilinas, cefalosporinas e β -lactamases de amplo espectro que geralmente são inibidas por inibidores de β -lactamases e o grupo 3 que são das metalo- β -lactamases que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e que não são inibidas por inibidores comerciais de β -lactamases.

A classificação de Ambler, baseada na estrutura molecular foi proposta em 1980, quando somente quatro seqüências de aminoácidos de β -lactamases eram conhecidas, sendo proposta apenas as classes A das penicilinas e a classe B das metalo- β -lactamases. Posteriormente as classes C das cefalosporinas foi descrita por Jaurin e Grundstrom em 1981 e a classe D das oxacilinases, que foi criada a partir de outras serino- β -lactamases, foram incluídas nesta classificação (Bush *et al.*, 1995).

2.3.1 Metallo- β -lactamases

As metallo- β -lactamases (MBLs) são capazes de hidrolizar todos os antimicrobianos β -lactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção o monobactam aztreonam (Bush, 2001). O principal fator que distingue este grupo de β -lactamases é que essas enzimas são inibidas por EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético) ou compostos derivados do ácido tiolático e não são inibidas por inibidores de serino- β -lactamases disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Bebrone, 2007).

Em meados de 1960 a primeira MBL foi descrita como uma enzima dependente de zinco produzida por *Bacillus cereus*, um microrganismo considerado como sendo um patógeno de pouca importância clínica (Sabath e Abraham, 1966 in Bush, 1998). Desde o início de 1990, novos genes que codificam MBL tem sido descritos em patógenos clinicamente importantes como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e membros da família Enterobacteriaceae (Toleman *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005). Muitos genes de MBL estão presentes em espécies ambientais, constituindo reservatórios de genes de resistência (Bebrone, 2007).

Enzimas MBLs codificadas pelo cromossomo têm sido identificadas em várias espécies bacterianas como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp. e *Chryseobacterium* spp. Em 1991 foi detectada uma nova MBL mediada por plasmídeo chamada de IMP1 produzida por *Pseudomonas aeruginosa*. Esta enzima causou grande preocupação pelo risco de disseminação que apresentava para outras espécies de bactérias (Walsh *et*

al., 2002). MBLs móveis ou adquiridas são codificadas por genes *bla*, estes são tipicamente encontrados em integrons de classe 1 e movem-se entre organismos principalmente em plasmídeos, mas também em transposons, localização que facilita a disseminação horizontal. Os genes *bla* frequentemente são encontrados em associação com genes tipo *aac*- ou *aad*- que conferem resistência a aminoglicosídeos ou com β -lactamases de espectro estendido (ESBL) ou genes tipo OXA, TEM e CTX (Rasmussen *et al.*, 1997; Maltezou, 2008).

Os tipos de MBLs conhecidas até o momento são: IMP (imipenemase) (Osano *et al.*, 1994), VIM (verona imipenemase) (Lauretti *et al.*, 1999), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase) (Toleman *et al.*, 2002), GIM (Germany imipenemase) (Castanheira *et al.*, 2004), SIM (Seoul imipenemase) (Lee *et al.*, 2005), AIM (Australian imipenemase) (Gupta, 2008), KHM (Kyorin Hospital metalo- β -lactamase) (Sekiguchi *et al.*, 2008) e, mais recentemente a NDM-1 (New Delhi MBL) (Yong, 2009).

As enzimas IMP e VIM são as MBLs mais prevalentes e com uma ampla distribuição geográfica. Atualmente já estão descritos 18 tipos de enzimas IMP (IMP1 – IMP18), com amplo espectro de perfil de resistência incluindo cefalosporinas de espectro estendido, carbapenêmicos e inibidores de β -lactamases como ácido clavulânico e sulbactam. Das enzimas do tipo VIM já estão descritos 12 tipos (VIM1-VIM12) que apresentam uma significativa redução na suscetibilidade a penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, mas mantém suscetibilidade ao aztreonam (Maltezou, 2008).

Os genes das enzimas *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP} são encontrados inseridos em genes cassete em regiões variáveis de integrons (YUM *et al.*, 2002). Os

integrons têm sido encontrados em várias espécies bacterianas, e as classes 1, 2 e 3 de integrons tem sido encontradas em bacilos Gram-negativos patogênicos como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Entre esses integrons, as classes 1 e 3 têm sido indicadas como determinantes genéticos que carregam as MBLs (Shibata *et al.*, 2003).

Em hospital de São Paulo foram encontrados isolados de *Pseudomonas aeruginosa* produtores de uma nova MBL chamada de SPM e isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. produtores de MBL do tipo IMP1 (Gales *et al.*, 2003). Outros estudos demonstraram isolados portadores da enzima IMP1, mas até o momento foi a única MBL encontrada em *Acinetobacter* sp. no Brasil (Fritsche *et al.*, 2005; Sader *et al.*, 2005; Tognim *et al.*, 2006).

Em isolados de *Acinetobacter* spp. já foram detectados genes para produção de metalo- β -lactamases: IMP1 (Fritsche *et al.*, 2005 e Yum *et al.*, 2002); IMP2 (Fritsche *et al.*, 2005 e Hall *et al.*, 2004); IMP4 (Chu *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2004 e Houang *et al.*, 2003); IMP5 (Da Silva *et al.*, 2002 e Hall *et al.*, 2004); VIM1 (Fritsche *et al.*, 2005 e Yum *et al.*, 2002), VIM2 (Fritsche *et al.*, 2005 e Yum *et al.*, 2002) e SIM1 (Lee *et al.*, 2005). Apesar deste número de genes de MBLs identificados em isolados de *Acinetobacter* spp. as enzimas do tipo OXA são as mais prevalentes.

2.3.2 Oxacilinases

As enzimas do tipo OXA tem a capacidade de hidrolizar oxacilinases como substrato preferencial, por esta razão receberam este nome. Atualmente se tem 102 seqüências únicas de OXA identificadas, onde 9 são β -lactamases de espectro estendido e pelo menos 37 são consideradas carbapenemases

(Rasmussen e Hoiby, 2006). Atividade em carbapenêmicos é uma propriedade intrínseca de algumas oxacilinases que possuem a capacidade de hidrolizar imipenem, mas nem sempre meropenem (Poirel e Nordmann, 2006). Elas também apresentam atividade em amoxicilina, meticilina, cefaloridina e cefalotina, somente poucas variantes de espectro estendido têm atividade sobre as cefalosporinas.

Os membros de β -lactamase do tipo OXA com elevada similaridade genética fazem parte de um mesmo sub-grupo filogenético. As oxacilinases com atividade de carbapenemase são divididas em 9 sub-grupos como demonstrado na Tabela 2.

No gênero *Acinetobacter* já foram identificadas enzimas dos sub-grupos: OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 (Higgins *et al.*, 2010). Elas são, em geral, pouco inibidas por ácido clavulânico e EDTA e tem uma grande variabilidade em suas seqüências de aminoácidos (Bush *et al.*, 1995).

A maioria das carbapenemases do tipo OXA tem sido descobertas em isolados clínicos de *A. baumannii* em todo o mundo. A primeira β -lactamase do tipo OXA com atividade de carbapenemase foi descrita por Paton *et al.* (1993). A enzima foi purificada de uma cepa de *A. baumannii* multirresistente isolado de um paciente na Escócia. A enzima foi chamada de ARI-1 (“*Acinetobacter* resistente a imipenem”) e localizada em um grande plasmídeo. O seqüenciamento da enzima demonstrou que pertencia a família das β -lactamases do tipo OXA e foi chamada de OXA-23 (Donald *et al.*, 2000). Pertencem ao sub-grupo da OXA-23, as enzimas OXA-27, identificada em um isolado de *A. baumannii* em Singapura e OXA-49 também identificada em um isolado de *A. baumannii* da China (Poirel e Nordmann, 2006).

Tabela 2- Sub-grupos de β -lactamases da família OXA carbapenemase.

Sub-grupos das enzimas OXA	Membros adicionais
OXA-23 (ARI-1)	OXA-27 e OXA-49
OXA-24	OXA-25, OXA-26, OXA-40 e OXA-72
OXA-51	OXA-64 até OXA-71, OXA-75 até OXA-78, OXA-83, OXA-84, OXA-86 até OXA-89, OXA-91, OXA-92, OXA-94 e OXA-95.
OXA-58	Nenhum
OXA-55	OXA-SHE
OXA-48	OXA-54, OXA-SAR2
OXA-50	OXA-50a até OXA-50d, PoxB
OXA-60	OXA-60a até OXA-60d
OXA-62	Nenhum

Adaptado de Queenan e Bush, 2007.

O gene *bla*_{OXA-23} tem sido identificada em surtos de *A. baumannii* no Brasil, Coréia, Tahiti, Reino Unido, Bulgária, Taiwan, Itália, França, China, Índia, Singapura e Hong Kong (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Queenam e Bush, 2007; Mendes *et al.*, 2009a; Mendes *et al.*, 2009b; Martins *et al.*, 2009; Stoeva *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009).

O primeiro relato da enzima OXA-23 em *A. baumannii* no Brasil foi em um trabalho realizado por Dalla-Costa *et al.* (2003) que descreveu um surto na cidade de Curitiba. Outros trabalhos foram realizados recentemente no Brasil e também identificaram surtos de isolados de *Acinetobacter* com gene para produção desta enzima (Carvalho *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009).

O gene *bla*_{OXA-23} foi identificado em cinco isolados de *A. radioresistens* sensíveis a carbapenêmicos. Esta espécie é considerada

comensal da pele de indivíduos saudáveis, apresentando uma virulência muito baixa, pois foi associado apenas a uma bacteremia até o momento. O gene foi localizado no cromossomo destes microrganismos, os autores sugerem que *A. radioresistens* é o progenitor do gene *bla*_{OXA-23} e que a disseminação deste gene para *A. baumannii* está associado com elementos de inserção, como ISAb1 (Poirel *et al.*, 2008).

A enzima tipo OXA-51 foi encontrada pela primeira vez em um isolado clínico na Argentina, mas hoje vários estudos revelam que este gene está presente no gênero *Acinetobacter* em vários continentes (Vahaboglu *et al.* 2006). Fazem parte do grupo das enzimas tipo OXA-51 um grande número de variantes com os números: 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 75, 76, 77, 83, 84, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94 e 95 (Turton *et al.* 2006).

Enzimas do tipo OXA-51 têm sido encontradas em todas as cepas de *A. baumannii* testadas e podem ser um componente natural do cromossomo desta espécie (Heritier *et al.*, 2005). Por esta razão muitos estudos têm utilizado o gene *bla*_{OXA-51} para realizar a identificação desta espécie, que é a mais comum em Infecções Associadas à Assistência à Saúde (IAAS) causadas pelo gênero *Acinetobacter* (Turton *et al.*, 2006). Porém, recentemente o gene da carbapenemase *bla*_{OXA-51} foi encontrada em um isolado clínico da espécie genômica *Acinetobacter* 13 TU. O gene *bla*_{OXA-51} e o elemento de inserção ISAb1, localizado acima do gene da enzima, foram identificados em um plasmídeo, seu seqüenciamento sugere que sua origem é do gene *bla*_{OXA-51} cromossomal encontrado na espécie *A. baumannii* (Lee *et al.*, 2009).

A presença deste gene não está necessariamente relacionada à resistência aos carbapenêmicos, pois depende do elemento de inserção

ISAbal, o qual quando localizado acima do gene *bla*_{OXA-51} funciona como promotor da expressão, contribuindo para o aumento da expressão dos níveis de resistência a carbapenêmicos (Merkier and Centrón 2006).

2.4 Resistência a antimicrobianos no ambiente e efluente hospitalar

Uma importante parte da dispersão e evolução de bactérias resistentes a antimicrobianos depende do ambiente aquático. Na água, bactérias de diferentes origens (humana, animal, ambiental) misturam-se, e a resistência evolui como consequência de trocas promíscuas e um “embaralhar” de genes. Ao mesmo tempo antimicrobianos, desinfetantes e metais pesados são lançados na água e podem exercer uma atividade seletiva, bem como um dano ecológico às comunidades deste ambiente aquático, resultando em uma maior resistência aos antimicrobianos (Baquero *et al.*, 2008).

Sabe-se que ambientes fortemente seletivos, como o ambiente hospitalar, podem levar a um aumento da frequência de bactérias resistentes a antimicrobianos e estas podem ser liberadas no efluente hospitalar (Goñi-Urriza *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2008). Há mais de três décadas, estudos demonstram que efluentes hospitalares apresentam níveis mais elevados de bactérias entéricas resistentes a antimicrobianos do que efluentes derivados de outras fontes e, que a concentração de antimicrobianos na água que recebe o efluente hospitalar também é superior, criando um ambiente com forte pressão seletiva (Linton *et al.*, 1974).

Antimicrobianos são poluentes persistentes, permanecem estáveis no ambiente, não sendo biodegradados pelas bactérias (Kümmerer, 2004; Costanzo *et al.*, 2005). Os antimicrobianos ciprofloxacina, tetraciclina,

ampicilina, trimetropim, eritromicina e trimetropim/sulfametoxazol foram detectados em amostras de água e efluente em estudo realizado na Austrália, neste mesmo estudo todas as bactérias isoladas destas amostras foram resistentes a pelo menos dois dos seis antimicrobianos encontrados na água e efluente (Costanzo *et al.*, 2005).

O “*design*” do antimicrobiano carbapenem foi inspirado num produto natural, a tienamicina, produzido por *Streptomyces cattleya*, um microrganismo do solo. Pela presença destas moléculas no solo, é esperado que enzimas capazes de degradar estes β -lactâmicos possam ser produzidas por organismos do ambiente tais como *Bacillus cereus* e *Bacillus anthracis*, bactérias com MBLs bem caracterizadas, que proporcionam uma vantagem seletiva para o crescimento destes microrganismos no ambiente.

Estas carbapenemases cromossomais podem ter evoluído inicialmente de um mecanismo da bactéria para se proteger de perigos externos a sua parede celular, mas além disso, estas β -lactamases podem empregar um papel na regulação da síntese da parede celular. O problema da resistência aos carbapenêmicos se agrava quando os genes para produção destas enzimas estão associados a determinantes genéticos móveis. A transmissão de genes de carbapenemases pode ocorrer rapidamente quando localizados em elementos móveis, tais como plasmídeos e integrons (Queenan e Bush, 2007).

A aquisição e dispersão de determinantes de resistência a antimicrobianos entre populações de bactérias virulentas é o problema mais relevante para o tratamento de doenças infecciosas. Estudos com bactérias da era pré-antimicrobianos demonstraram que estas bactérias apresentavam o

mesmo número de plasmídeos que as bactérias da era pós-antimicrobianos, porém os plasmídeos não apresentavam genes de resistência. Com isso presume-se que a aquisição e disseminação entre bactérias patogênicas de resistência a antimicrobianos é uma consequência da pressão seletiva de antimicrobianos, como resultado da terapia antimicrobiana. Se estes genes não estavam presentes nas bactérias patogênicas, eles só podem ter se originado de bactérias do ambiente, onde provavelmente estes genes apresentavam um papel funcional (Alonso *et al.*, 2001)

É aceito que determinantes de resistência a antimicrobianos tenham se originado em organismos produtores de antimicrobianos, onde eles empregam uma função de proteção. Como estes antimicrobianos não estão sempre presentes no ambiente natural destas bactérias, nos podemos assumir que a força de seleção desta resistência intrínseca deve ser diferente da pressão seletiva causada por antimicrobianos.

No ambiente esta pressão seletiva pode estar ocorrendo pela presença do gene de resistência no mesmo amplicon que carrega um outro elemento de seleção. Este elemento pode ser genes para resistências a metais pesados ou agentes químicos, os quais são por sua vez selecionados pela poluição por metais pesados ou agentes químicos (Alonso *et al.*, 2001). Resistência a metais pesados e antimicrobianos geralmente estão localizados no mesmo plasmídeo (Baquero *et al.*, 2008). Estas observações indicam que o ambiente também tem um papel na seleção sobre estes microrganismos (Alonso *et al.*, 2001).

É provável que a circulação de genes das carbapenemases ocorra em duas direções: fontes ambientais podem fornecer material genético como

fonte destas enzimas e cepas clínicas pode dispersar esta informação tanto no ambiente hospitalar como para o meio ambiente (Queenan e Bush, 2007).

O exemplo mais marcante de seleção de microrganismo intrinsecamente resistente pelo ambiente são os patógenos oportunistas Gram-negativos de origem ambiental, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia* (Alonso *et al.*, 2001).

Em estudo realizado com *Pseudomonas aeruginosa* isolada de efluente hospitalar e corpos de água em duas cidades do Rio Grande do Sul, foram encontrados isolados resistentes a carbapenêmicos que apresentavam genes da carbapenemase *bla*_{SPM-1} (Fuentefria *et al.*, 2009). Outros estudos também identificaram genes de resistência a antimicrobianos em bactérias isoladas de efluente, como Schwartz *et al.* (2003) que encontrou bactérias carregando gene *vanA* e isolados de *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* e Enterobactérias de efluente hospitalar que apresentaram genes de resistência a gentamicina (Heuer *et al.*, 2002).

A carbapenemase VIM-2 foi encontrada em *Pseudomonas pseudoalcaligenes* em esgoto hospitalar (Quintera e Luisa-Peixe, 2005). Em outro estudo bacteriófagos carregando genes das β -lactamases do tipo OXA foram isolados de efluente, sugerindo um vetor de transmissão destes genes entre microrganismos (Queenan e Bush, 2007).

Genes de resistência a antimicrobianos podem ser identificados diretamente de amostras de água ou efluente hospitalar (Kümmerer, 2004). Schwartz *et al.* (2003) identificou a presença de AmpC através da amplificação por PCR em amostras de água.

2.5 Tipificação de *Acinetobacter* spp.

As técnicas moleculares têm recebido grande atenção como método para analisar inter-relações epidemiológicas. O papel da tipificação molecular é determinar se organismos epidemiologicamente relacionados são também geneticamente relacionados, assim como estabelecer o grau de similaridade entre os diferentes isolados, auxiliando na identificação de surtos e na identificação da fonte (ambiental ou pessoas) do organismo, distinguindo infecções de cepas não infecciosas, e reincidência da infecção (Singh *et al.*, 2006).

2.5.1 Amplificação de Sequências Intergênicas Repetidas de Enterobactérias (ERIC-PCR)

Elementos de DNA repetitivos dispersos ocorrem naturalmente e são encontrados em muitos, se não em todos, gêneros bacterianos e podem servir como sequências iniciadoras para a amplificação do DNA genômico (Versalovic *et al.*, 1991). Diferentes famílias de seqüências repetitivas estão dispersas no genoma de diversas espécies bacterianas, entretanto três famílias são as mais estudadas: o elemento REP (*repetitive extragenic palindromic*) de 35-40pb. O elemento ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) de 124-127 pb e o elemento BOX de 154pb (Versalovic *et al.*, 1991). Todos esses elementos possuem seqüências palindrômicas invertidas e repetidas centrais altamente conservadas. A verdadeira função desses elementos altamente repetitivos e conservados ainda é um enigma, embora seu envolvimento na estabilização do mRNA (Newbury *et al.*, 1987), recombinação homóloga (Shyamala *et al.*, 1990), organização do cromossomo e ligação a proteínas

DNA girase e DNA polimerase I tenha sido sugerido (Yang & Ames, 1988; Gilson *et al.*, 1990). Entretanto, até o momento, nenhuma função específica é capaz de explicar satisfatoriamente a conservação da seqüência de DNA e sua ubíqua distribuição no genoma bacteriano (Hulton *et al.*, 1991).

Essas seqüências consenso permitiram que Versalovic *et al.* (1991) desenhasse oligonucleotídeos iniciadores (oligos) específicos para o elemento ERIC e testasse o genoma de uma grande variedade de eubactérias para a presença dessas seqüências tipo-ERIC, através da PCR. O elemento ERIC pode ser amplificado com um único *oligos* ou com um par de *oligos*, ERIC1 e ERIC2 (Versalovic *et al.*, 1991). As regiões localizadas entre os elementos ERIC, variam de tamanho devido a diferença entre cepas individuais e, assim, fragmentos de diferentes tamanhos são amplificados, criando padrões únicos e característicos quando separados por eletroforese em gel de agarose. Assim, a ERIC-PCR proposta por Versalovic *et al.* (1991) como uma metodologia útil para tipificação de genomas bacterianos, mostrando-se uma metodologia com grande poder discriminatório e boa reprodutibilidade.

No gênero *Acinetobacter* poucos estudos utilizaram esta técnica na tipificação de isolados, mas ela se mostrou eficiente na identificação de clones. Estudo realizado por Jeong *et al.* (2006) utilizaram esta técnica em 53 isolados de *A. baumannii* de amostras clínicas e obtiveram um perfil genético equivalente ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e dois isolados positivos para a presença do gene *bla*_{IMP} apresentaram perfis idênticos, sendo considerados clones pelos autores.

Em estudo realizado por Sung *et al.* (2008) na Coreia, a técnica de ERIC-PCR identificou 5 clones de *A. baumannii* positivos para o gene *bla*_{OXA-23}

e entre isolados positivos para *bla*_{IMP} foram encontrados 7 perfis distintos, sendo seis isolados com o mesmo perfis.

2.5.2. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*) é uma técnica de tipificação molecular capaz de gerar um “*fingerprinting*” do DNA bacteriano. A PFGE permite a separação de fragmentos de DNA muito grandes, variando de 10 a 6000 Kb, tornando possível a análise e comparação de todo DNA bacteriano. Esta técnica é reconhecida como “padrão-ouro” para identificação de linhagens bacterianas, fúngicas e de protozários (Magalhães *et al.*, 2005).

O sistema mais utilizado é o CHEF (*contour-clamped homogeneous electric field*), que utiliza uma câmara com múltiplos eletrodos, permitindo estabelecer condições com campos elétricos altamente eficientes para separação; geralmente o sistema reorienta as moléculas de DNA pela mudança do campo elétrico em ângulos de 120°C (Singh *et al.*, 2006).

A técnica de PFGE emprega endonucleases de restrição que fazem a clivagem do DNA bacteriano, devido a alta especificidade destas enzimas, a digestão do DNA fornece um padrão de fragmentos que será idêntico quando os isolados forem clones (Singh *et al.*, 2006). O critério utilizado para interpretação dos padrões gerados na PFGE é o descrito por Tenover *et al.* (1995). Para *Acinetobacter* sp. as enzimas mais utilizadas são *Sma*I e *Apa*I (Seifert e Gerner-Smidt, 1995; Gales *et al.*, 2004; Durmaz *et al.*, 2009).

A PFGE tem se mostrado superior a maioria dos métodos de tipificação molecular, com grande poder discriminatório na análise de *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*,

Pseudomonas aeruginosa, entre outros (Gales *et al.*, 2004; Biavasco *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2008; Laing *et al.*, 2008; Durmaz *et al.*, 2009).

Vários métodos genotípicos tem sido utilizados para tipificar isolados de *Acinetobacter* SP., incluindo análise de macrorestrição com PFGE, Em trabalho realizado por Prashanth e Badrinath (2005) com cepas de *Acinetobacter* spp. de um surto na Índia, utilizaram a técnica PFGE que pode claramente distinguir cepas não relacionadas epidemiologicamente e identificou 4 surtos causados por clones de *A. baumannii* e *Acinetobacter* do grupo 13TU. Seifert e Gerner-Smidt (1995) comparando as técnicas moleculares de PFGE e ribotipagem puderam concluir que ambas podem ser utilizadas para o delineamento de Infecções Associadas à Assistência à Saúde (IAAS) por *Acinetobacter*. No entanto, PFGE parece ser mais discriminatório que a ribotipagem, mas por outro lado, a ribotipagem pode ser utilizada para a identificação em nível de espécie ao contrário do PFGE.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 ARTIGO 1

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS EM CEPAS DE
Acinetobacter spp. ISOLADAS DE EFLUENTE HOSPITALAR EM PORTO
ALEGRE-RS**

Publicado na revista:

**Caderno de Farmácia, da Faculdade de Farmácia da UFRGS. v. 23, p. 9-14,
2007.**

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS EM CEPAS DE *Acinetobacter spp.* ISOLADAS DE EFLUENTE HOSPITALAR EM PORTO ALEGRE-RS

Alessandra Einsfeld Ferreira¹, Gabriela Rosa da Cunha², Daiane Bopp Fuentes¹, Gertrudes Corção³ (orient.)

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS; ²Acadêmica de Farmácia, UFRGS; ³Professora Adjunta do Departamento de Microbiologia, UFRGS, Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
Contato: einsfeld@gmail.com, corcao@ufrgs.br

RESUMO

O uso excessivo de antimicrobianos em todo o mundo tem selecionado bactérias resistentes, grandes causadoras de surtos de infecções hospitalares. O ambiente hospitalar favorece este processo, tornando o efluente destes locais um reservatório de bactérias resistentes. Este trabalho tem como objetivo delinear o perfil de sensibilidade a antimicrobianos em isolados de *Acinetobacter spp.* provenientes de efluentes hospitalares. Foram realizadas coletas de efluentes de dois hospitais de Porto Alegre-RS. A identificação das cepas realizou-se através de provas bioquímicas e análise molecular para confirmação do gênero. Foi determinado o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, através da técnica de disco-difusão. Foram isoladas 81 cepas no hospital I e 86 no hospital II. O hospital II apresentou maior número de cepas resistentes, no hospital I foi verificado 18 cepas multi-resistentes, já no hospital II foram encontradas 37 cepas multi-resistentes. Cepas resistentes a imipenem e meropenem só foram encontradas no hospital II. Nos 2 hospitais nenhuma cepa foi resistente a polimixina B e 17 cepas foram sensíveis a todos os antibióticos. Analisando os efluentes liberados pelos hospitais, pode-se perceber a grande incidência de bactérias do gênero *Acinetobacter* multi-resistentes, que estão sendo lançadas em ambientes aquáticos, permitindo posterior disseminação de genes de resistência.

PALAVRAS-CHAVE: *Acinetobacter spp.*, resistência bacteriana, efluente hospitalar.

ABSTRACT

The appearance of bacterial resistance, principal cause of nosocomial infections, may indicate the degree of selection exerted by the indiscriminate use of antibiotics all over the world. The hospital setting may facilitate that process, transforming the hospital sewage in environmental reservoirs of antibiotic resistance. In this study, we aimed to determinate the susceptibility profile of *Acinetobacter spp.* strains from hospital sewage. Samples were collected from two hospital sewage located in Porto Alegre, RS. Biochemical tests and 16S rDNA amplification were used to identify *Acinetobacter* strains. Susceptibility was determined by the disk diffusion method. A total of 81 and 86 strains were identified from Hospital I and Hospital II, respectively. Hospital II showed higher rate of resistance, being 37 multi-resistant strains against 18 from Hospital I. Imipenem and meropenem resistant strains were only detected in Hospital II. All isolates of this study were susceptible to polymyxin B, being 17 strains susceptible to all antimicrobials tested. It is noteworthy that high rate of multi-resistant *Acinetobacter* strains are being discharged in aquatic environments that constitute an important route of resistance genes dissemination.

Key words: *Acinetobacter spp.*, bacterial resistance, hospital sewage

INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* atualmente é formado por 29 espécies, apresentam a forma de cocobacilo, são aeróbicos, Gram negativos e não fermentadores. Este gênero tem emergido como um importante patógeno nosocomial em pacientes imunocomprometidos, principalmente pacientes de CTI e queimados (ZEANA e col., 2003).

O número de infecções nosocomiais causadas por cepas de *Acinetobacter spp.* tem aumentado em todo o mundo. Surtos de infecções por *Acinetobacter* têm sido verificados em hospitais de Porto Alegre-RS e em outros locais do Brasil (GALES e col., 2003) (SADER e col., 2005).

O gênero *Acinetobacter* está amplamente distribuído no ambiente e

apresenta a capacidade de sobreviver em ambientes adversos, como locais secos, por longos períodos. Estas características possibilitam a este microrganismo uma oportunidade de sobreviver no ambiente hospitalar e ser transmitido de um paciente para outro através de médicos e funcionários do hospital, bem como instrumentos utilizados na prática médica. Este gênero também apresenta grande habilidade de adquirir rapidamente resistência a antibióticos (PELEG e PATERSON 2006).

Desde 1970 isolados clínicos de *Acinetobacter* têm apresentado resistência a antibióticos. Inicialmente adquiriram resistência a penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração, cefamicina, aminoglicosídeos, cloranfenicol e tetraciclina. Este gênero atualmente é resistente a muitas classes de antibióticos, seja intrinsecamente ou pela aquisição de fatores genéticos (HANLON 2005).

O ambiente hospitalar é considerado um local altamente seletivo de cepas resistentes a antibióticos, sendo assim, o efluente hospitalar pode se tornar uma via de disseminação de cepas multi-resistentes para o ambiente, assim como também pode ocasionar a transferência horizontal de genes de resistência para outras cepas do mesmo gênero ou até mesmo outros gêneros bacterianos. Por estas razões o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de isolados de *Acinetobacter spp.* no efluente de dois hospitais de grande porte em Porto Alegre-RS, assim como determinar seu perfil de sensibilidade a antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foi coletado o efluente de dois hospitais de Porto Alegre-RS (Tabela 1).

Tabela 1- Características dos hospitais estudados.

	HOSPITAL I	HOSPITAL II
Número de leitos	539	882
Número de funcionários	2.885	4.115
Número de consultas/mês	30.000	67.600
Área (m ²)	55.000	43.030

No hospital I foi coletado o efluente de um ponto, correspondente a todas as áreas do hospital. Já no hospital II foram coletadas amostras de efluente em 6

pontos distintos do hospital, como demonstrado na Tabela 2.

De cada ponto de coleta do efluente foi retirada uma amostra de um litro. Os frascos com as amostras foram conservados em isopor com gelo e levados até o Laboratório de Microbiologia-ICBS da UFRGS onde foram realizadas as análises.

Tabela 2 – Áreas dos hospitais correspondentes aos pontos de coleta analisados.

Pontos de coleta		Áreas do Hospital	
Hospitais	I	A	Todas as áreas do hospital
	II	B	Enfermaria
		C	Enfermaria, CTI, bloco cirúrgico, hemodiálise e laboratório de análises clínicas
		D	Cozinha, banco de sangue, anatomia patológica
		E	Geral
		F	Cozinha
		G	Lavanderia

Detecção de *Acinetobacter spp.*

Identificação fenotípica

Inicialmente foi realizada a concentração da amostra pela técnica de Membrana Filtrante, utilizando filtros de fibra de vidro de 45 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm para reter as bactérias. Uma alíquota de 100 mL de cada amostra de efluente foi filtrada, após o filtro foi dobrado com auxílio de uma pinça estéril e inserido em um tubo contendo 10 mL de água peptonada.

Após a dissolução do filtro no tubo, foram realizadas diluições deste e alíquotas de cada diluição foram semeadas em placas contendo meio sólido MacConkey e incubadas a 30°C por 48 horas.

Após incubação, as colônias características foram isoladas e para confirmação do gênero *Acinetobacter* foram realizadas colorações de Gram, teste de oxidase e TSI.

Os isolados foram estocados em caldo BHI com 15% de glicerol.

Amplificação do 16S rDNA

Os isolados de *Acinetobacter spp.* fenotipicamente identificados, foram submetidos a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores: Acin16S F (5' – CCT TGC GYT AAT AGA TGA GC – 3') e Acin16S R (5' –GTA GCA ACC CTT TGT ACC GA – 3') específico para o gênero *Acinetobacter*. Este primer foi desenhado utilizando o alinhamento das seqüências do

16S de 20 espécies do gênero *Acinetobacter*.

Teste de sensibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade dos isolados foi testada frente a 11 antimicrobianos (amicacina, aztreonam, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam, polimixina B e ticarcilina-clavulanato), através da metodologia de disco-difusão e de acordo com as normas do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). A interpretação dos halos de inibição obtidos para polimixina B seguiu o protocolo sugerido por GALES e col. (2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras coletadas dos efluentes de dois hospitais de Porto Alegre foram isoladas 167 cepas de *Acinetobacter spp.*, sendo 81 do hospital I e 86 do hospital II.

No hospital I, por ser um hospital vertical foi realizada a coleta em apenas um ponto do efluente, que continha o esgoto de todo o hospital.

No hospital II foi realizada a coleta em 6 pontos do efluente que correspondiam a setores diferentes do hospital. Foram encontradas cepas de *Acinetobacter spp.* em apenas 4 dos 6 pontos coletados. No ponto B que corresponde a enfermaria foram isoladas 6 cepas; no ponto C, correspondente aos setores enfermaria, CTI, bloco cirúrgico, hemodiálise e laboratório de análises clínicas foram encontradas 25 cepas e no ponto D que corresponde a cozinha, banco de sangue e anatomia patológica foram isoladas 13 cepas.

O maior número de isolados foi verificado no ponto G, correspondente a lavanderia.

O gênero *Acinetobacter* é comumente encontrado na pele humana, sendo detectado nos pacientes em muitos hospitais, assim como entre os funcionários e médicos do hospital (VILLEGAS e col., 2003). Possivelmente por esta razão tenha se encontrado um maior número de isolados no efluente proveniente da lavanderia.

Nos pontos E e F que correspondem ao efluente geral e cozinha, respectivamente, não foram encontradas

cepas de *Acinetobacter spp.*. No ponto E este fato pode ter sido ocasionado por este ponto juntar o efluente de todo o hospital, conseqüentemente este poderia estar mais diluído, dificultando o isolamento destas cepas. Já no ponto F, correspondente ao efluente da cozinha, observou-se uma grande quantidade de gordura na superfície e um baixo fluxo de efluente, diminuindo sua oxigenação. Estes podem ser os fatores responsáveis pela ausência destas cepas nas amostras coletadas.

Após a confirmação do gênero *Acinetobacter* por amplificação do 16S do rDNA, foi realizado antibiograma de todas as cepas para verificar seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

No hospital I, das 81 cepas analisadas 11 (14%) foram sensíveis a todos os antibióticos testados. Nenhuma cepa apresentou resistência aos antibióticos imipenem e meropenem, drogas de escolha para o tratamento de infecções nosocomiais causadas por *Acinetobacter spp.* (Figura 1).

Altos índices de perda de sensibilidade foram encontrados para aztreonam, com 53 (65%) isolados. Índices altos de resistência a aztreonam foram verificados em outros estudos, como o realizado por PINO e col. (2007), onde 132 cepas de *Acinetobacter baumannii*, isolados de hospitais no Chile, foram analisadas e nos períodos de 1995-1996 e 1997-1998, 94,1% e 90,6% foram resistentes, respectivamente.

Os antibióticos amicacina, ceftazidima e ciprofloxacina foram os antibióticos com mais isolados resistentes, tendo 22 (27%), 19 (23%) e 18 (22%) isolados, respectivamente.

No hospital I foi verificado 18 cepas multi-resistentes, considerando multi-resistência como diminuição da sensibilidade a pelo menos 1 antibiótico de 5 classes diferentes (PETERSON, 2006).

O hospital II apresentou apenas 6 cepas, das 86 analisadas, sensíveis a todos os antibióticos testados. O número de cepas multi-resistentes neste hospital foi superior ao hospital I, tendo 37 cepas (43%) (Figura 1).

Foram verificadas 2 cepas panresistentes, ambas no ponto G (lavanderia), e 13 cepas foram sensíveis apenas a imipenem e polimixina B, sendo 12 também isoladas do ponto G.

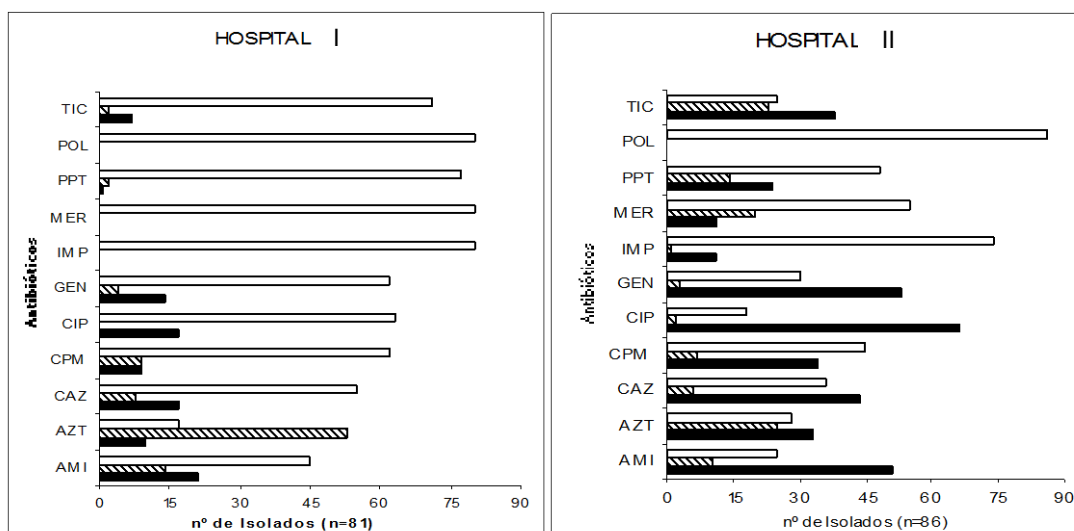


Figura 1 - Perfil de sensibilidade a antibióticos encontrado para os isolados de *Acinetobacter* spp. do efluente dos hospitais A e B de Porto Alegre – RS. Os antibióticos testados foram: TIC – ticarcilina + ác. Clavulânico, POL – polimixina B, PPT – piperacilina tazobactam, MER – meropenem, IMP – imipenem, GEN – gentamicina, CIP – piprofloxacim, CPM – cefepime, CAZ – ceftazidima, ATM - aztreonam e AMI-amicacina.

Barras: ■ Resistente ▨ Intermediário □ Sensível

O hospital II apresentou índices de resistência superior aos encontrados para o hospital I, sendo o antibiótico ciprofloxacina o com maior número de cepas resistentes (77%). Os antibióticos gentamicina, amicacina e ceftazidima apresentaram mais da metade das cepas resistentes, com 54 (63%), 50 (59%) e 45 (52%) cepas, respectivamente. Um grande número de isolados resistentes a estes antibióticos foi encontrado em isolados de *Acinetobacter baumannii* de hospitais da Espanha. De 354 isolados analisados, 296 (83,6%) foram resistentes a gentamicina, 272 (76,8%) resistentes a ceftazidima e 145 (41%) resistentes a amicacina (OTEO e col., 2007).

Analisando o perfil das cepas dos 4 pontos de coleta do hospital II (Figura 2), pode-se observar que as cepas dos pontos B e D apresentam maior sensibilidade aos antibióticos, enquanto o maior número de cepas resistentes foi encontrados nos pontos C e G. Com base nestes resultados podemos observar que setores como a CTI e bloco cirúrgico estão contribuindo para a liberação de cepas multi-resistentes, assim

como a lavanderia que contém roupas vindas de todas as partes do hospital.

Em ambos hospitais todas as cepas foram sensíveis a polimixina B, antibiótico de última escolha para tratamento devido a sua alta toxicidade.

Conclusões

Com base nestes resultados podemos concluir que cepas multi-resistentes estão presentes no efluente de ambos os hospitais, e conseqüentemente estão sendo lançadas no ambiente aquático. Nestes ambientes, estas cepas multi-resistentes podem disseminar genes de resistência, criando reservatórios de resistência bacteriana.

Este estudo demonstra a importância de sistemas de tratamento de efluentes nos hospitais de Porto Alegre-RS, com o objetivo de diminuir a carga microbiana lançada nos corpos de água e conseqüentemente a disseminação de genes de resistência entre bactérias do ambiente.

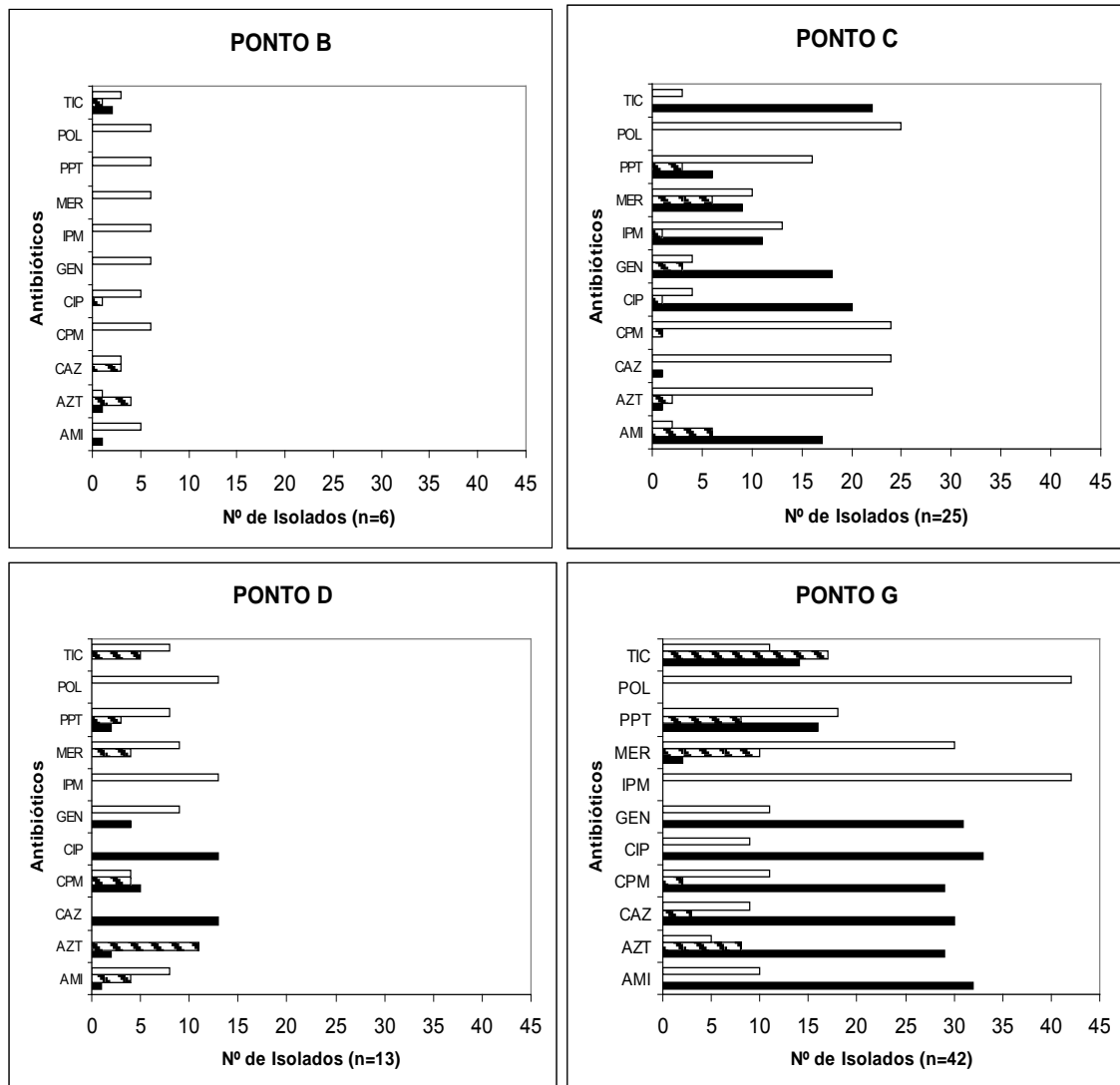


Figura 2 - Perfil de sensibilidade a antibióticos encontrado para os isolados de *Acinetobacter* spp. do efluente dos pontos B, C, D e G do hospital II. Os antibióticos testados foram: TIC – ticarcilina + á c. Clavulânico, POL – polimixina B, PPT – piperacilina tazobactam, MER – meropenem, IPM – imipenem, GEN – gentamicina, CIP – piprofloxacim, CPM – cefepime, CAZ – ceftazidima, ATM - aztreonam e AMI-amicacina.

Barras: ■ Resistente ▨ Intermediário □ Sensível

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GALES et al., Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 183-190, 2001.

GALES et al., Emergence of a IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.45, p.77-79, 2003.

HANLON, G. W., The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. **Letters in Applied Microbiology**, v.41, p.375-378, 2005.

OTEO et al., Genotypic diversity of imipenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Spain. **Journal of Infection**, doi:10.1016, p.1-7, 2007.

PATERSON, D. L., The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, p.S43-S48, 2006.

PELEG, A. Y.; PATERSON, D. L.; Multidrug-resistant *Acinetobacter*: a threat to the antibiotic era. **Internal Medicine Journal**, v.36, p.479-482, 2006

PINO et al., Producción de β -lactamasas de espectro estendido (BLEE) en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en

hospitales de la VIII^a Región, Chile. **Rev Chil Infect**, v.24, n.2, p.137-141, 2007.

SADER et al., Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, p.57-61, 2005.

VILLEGAS, M. V.; HARTSTEIN, A. I.; *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.24, n.4, p.284-295, 2003.

ZEANA et al., 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.

3.2 ARTIGO 2

**Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in
wastewater from hospitals in southern Brazil**

Artigo submetido para publicação na revista:

Microbial Drug Resistance

Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in southern Brazil

Alessandra E. Ferreira, Desirée P. Marchetti, Lyvia M. de Oliveira, Daiane B. Fuentefria, G. Corção *

Department of Microbiology, Institute of Basic and Health Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

*Corresponding author : Gertrudes Corção, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Sarmiento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre – RS, Brasil. Phone-Fax: (51) 3308 4111, E-mail: corcao@ufrgs.br

Abstract

The aim of the study was to evaluate the dissemination of multiresistant isolates of *Acinetobacter baumannii* carrying resistance genes, by samples of wastewater from hospitals in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. We obtained 303 bacterial isolates from the wastewater of three hospitals in Porto Alegre, Rio Grande do Sul. For each isolate, we determined the profile of susceptibility to antimicrobials and the presence of the genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM}. The *bla*_{OXA-51} gene was found in 56% of the isolates, indicating the presence of *A. baumannii* in this environment. Of these, three multiresistant isolates were positive for the *bla*_{OXA-23} gene, in wastewater from two of the hospitals. The results obtained in this study indicate that isolates of *A. baumannii* that are multiresistant and carry resistance genes such as *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23} are being released into the environment in the wastewater from the hospitals analyzed. Multiresistant *A. junii*, the newly emerging pathogen, were also found among the multiresistant isolates. Hospital wastewater may be crucial to the development and dispersal of multiresistant bacteria, making waterbodies reservoirs of bacterial resistance.

Keywords

Acinetobacter baumannii, hospital wastewater, *bla*_{OXA-23}.

Introduction

Pathogenic bacteria of humans and animals are constantly being released into waterbodies via wastewater.³ The hospital environment is considered to be highly selective for antimicrobial-resistant strains, which can make hospital wastewater a vector for dissemination of multiresistant bacteria.¹⁷ Many of these microorganisms carry resistance genes, which are occasionally inserted in movable regions of the bacterial DNA. The acquisition of these determinants of antimicrobial resistance by horizontal transfer has a large role in the development and dispersal of resistance among pathogenic bacteria.¹ Water is not only a route for the dissemination of resistant microorganisms among human and animal populations, but also a route for the dissemination of resistance genes in natural bacterial communities. In these communities, nonpathogenic bacteria may serve as a reservoir for resistance genes. In addition to the introduction of antimicrobials via hospital wastewater into waterbodies, detergents, disinfectants, and industrial residues such as heavy metals contribute to the evolution and dispersal of these resistant microorganisms in the aquatic environment.³

The most prominent examples of selection of microorganisms that are intrinsically resistant in the environment are the Gram-negative opportunist pathogens *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*, which are characteristic of soil.¹ The genus *Acinetobacter* is widely distributed and is capable of surviving in adverse environments, and also shows great ability to rapidly acquire resistance to antibiotics.^{4,22} In recent years, the genus *Acinetobacter* has been associated with a large number of outbreaks in hospitals worldwide,^{14, 23, 28, 34} including Brazil.^{7, 8, 11, 25}

In many cases, carbapenems have been the sole drug of choice for the treatment of infections caused by multiresistant *Acinetobacter* spp.. Among the mechanisms of resistance to carbapenems is the production of carbapenemases of classes B and D, according to the classification of Ambler.^{21,27} Class B enzymes (metallo- β -lactamases) reside in movable

regions of bacterial DNA, as do some class D enzymes, which can make these genes transferable to other bacteria. The enzyme OXA-23, a member of Class D, is located in a plasmid. This enzyme has been associated with various outbreaks of infection in different parts of the world,¹⁸ and has shown clonal dissemination in studies in Brazilian hospitals.^{7,8}

Studies on antimicrobial resistance normally focus on bacterial isolates obtained in clinical samples. However, genetic determinants of resistance are present in the microbial communities of natural environments and thus may be being selected and disseminated by means of untreated wastewater and released directly into waterbodies. In view of the existence of transferable determinants of resistance and the potential of the genus *Acinetobacter* to exchange genetic material, the objective of this study was to evaluate the dissemination of isolates of multiresistant strains of *A. baumannii* in samples from hospital wastewater in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul and to determine the presence of resistance genes.

Materials and Methods

Samples

Samples were collected from the wastewater of three large hospitals in Porto Alegre, RS, Brazil from August 2006 through September 2007. Untreated wastewater sampling was performed at the end of the hospital-building networks. It was done in a non-intentional and non-regular way, by convenience and without defined sazonal relationship. The hospitals included in the study were the Hospital São Lucas, with 539 beds and a circulation of 18,000 persons/day; the Hospital de Clínicas, with 714 beds and 12,000 persons/day; and the Hospital Conceição, with 840 beds and 21,000 persons/day.

Samples of 1 L of wastewater were collected. Aliquots of 100 ml were filtered on mixed-cellulose-ester membranes, 0.45 µm pore size. The membranes were transferred to

tubes containing 10 ml peptone water. After the filter was suspended in the tube, serial dilutions of this were made (10^{-1} to 10^{-4}) and aliquots of 100 μ l of each dilution were seeded onto dishes containing MacConkey agar. The dishes were incubated at 35°C for 48 hours, and after incubation the characteristic lactose negative colonies were selected.

Identification of the isolates of *Acinetobacter* spp:

The phenotypic identification of the isolates was made using Gram stain, the TSI and oxidase biochemical tests. The genus was confirmed by amplifying a fragment of 16SrDNA, using the pair of nucleotide primers Acin16S (5' – CCT TGC GYT AAT AGA TGA GC – 3') and Acin16S (5' –GTA GCA ACC CTT TGT ACC GA - 3'), which are specific for the genus *Acinetobacter*. This primer was designed using the sequence alignment available in GENBANK, of the 16S of 29 species of the genus *Acinetobacter*, using the program CLC FreeWorkbench 2.2. The amplification reactions were carried out in mixtures containing 3.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of dNTPs, 1 μ M of each primer, 1 U of Taq polymerase, 1x of reaction buffer of Taq polymerase, and 100 ng of bacterial DNA in a final volume of 30 μ l. We used an Eppendorf Mastercycler Personal thermocycler, with the following amplification conditions: an initial denaturation cycle at 95°C for 5 min, followed by 25 denaturation cycles at 95°C for 1 min, annealing at 52°C for 1 min, extension at 72°C for 1 min, and a final extension cycle at 72°C for 8 min. The species *A. baumannii* was identified by amplification of the *bla*_{OXA-51} gene fragment. This gene is found exclusively in isolates of this species, and can therefore be used to identify it.²⁶

Antimicrobial susceptibility test

The antimicrobial susceptibility profiles of the isolates of *Acinetobacter* spp. were determined using the disk-diffusion technique, according to the norms of the Clinical

Laboratory Standards Institute (2009). These antimicrobials were used: amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), ceftazidime (30 µg), piperacillin-tazobactam (100 µg/10 µg), ticarcillin-clavulanic acid (75 µg/10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), cefepime (30 µg), and aztreonam (30 µg). Isolates that showed resistance to 4 or more classes of antimicrobials were considered multiresistant. The strain *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27858 was used as a quality control in the susceptibility tests.

Phenotypic MBL detection test

For phenotypic triage of metallo-β-lactamase production, the disk-approximation test was carried out, using the substrates imipenem and ceftazidime, and the inhibitors EDTA and 2-mercaptopropionic acid.^{2,16,33} The phenotypic test for production of metallo-β-lactamase was also carried out to identify imipenem-resistant isolates, by the Etest- MβL method.²⁹

Extraction of DNA and detection of *bla* genes

The DNA of the isolates was obtained by the boiling method, according to Misbah et al.²⁰ The isolates that were resistant to imipenem, meropenem, and/or with a positive triage for production of metallo-β-lactamase were submitted to PCR reaction to assess the presence of the *bla*_{OXA-23like}, *bla*_{OXA-51like}, *bla*_{IMP}, and *bla*_{VIM} genes. The oligonucleotide primers listed in Table 1 were used. The reactions were carried out in mixtures containing 1x of Go Taq Master Mix (Promega), 1 µM of each primer and 100 ng of bacterial DNA, in a final volume of 15 µl. The amplification conditions were: an initial denaturation cycle at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, annealing temperature as in Table 1, extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 6 min. The PCR products were visualized in 1% agar gel, stained with ethidium bromide.

Sequencing

PCR products of the 16SrDNA fragment from selected isolates were purified using the EZ-10 Spin Column PCR* Products Purification Kit and sequenced on a MEGAbase 1000 sequencer (GE), using the DYEnamic ET Terminator Kit. Sequences were analysed using BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and submitted to GenBank (GenBank submission no GU289231, GU29535 and GU299536).

Results

We identified 303 isolates of *Acinetobacter* sp. in wastewater from the three hospitals: 105 isolates from the Hospital São Lucas, 97 from the Hospital Conceição and 101 from the Hospital de Clínicas. In the Hospital de Clínicas, 43% of the isolates showed susceptibility to all the antimicrobials tested. The Hospital Conceição showed 22% susceptible isolates and the Hospital São Lucas showed the largest number of susceptible isolates, 67%, compared to the other hospitals (Table 2). In all three hospitals, the largest number of isolates were susceptible to one of the carbapenems: 95% of isolates were susceptible to imipenem and 85% were susceptible to meropenem. The Hospital São Lucas had 12% multiresistant isolates and the Hospital de Clínicas and the Hospital Conceição showed similar results, with 39% and 41% multiresistant isolates respectively. The three hospitals showed higher percentages of resistance to the antimicrobials amikacin (39%), ceftazidime (40%) and ciprofloxacin (42%). In the Hospital Conceição, a high rate of resistance to gentamicin, with 57% resistant isolates, was observed. In the Hospital de Clínicas, 40% of the isolates showed resistance to Ticarcillin-clavulanic acid (Table 3). In the Hospital São Lucas, one isolate showed reduced susceptibility to all the antimicrobials tested; in the Hospital de Clínicas, two isolates, and no isolate in the Hospital Conceição.

In the phenotypic triage for MBL production that was carried out with all the isolates, using the antimicrobial imipenem and the inhibitor EDTA, 4% of the isolates from the Hospital São Lucas were positive, 2% from the Hospital Conceição and no positive isolate from the Hospital de Clínicas. In the test using the antimicrobial ceftazidime and the inhibitor 2-MPA, a larger number of isolates was found in all the hospitals: in the Hospital São Lucas 21% of the isolates showed a positive result in the test, 14% in the Hospital Conceição and 16% in the Hospital de Clínicas. Only four isolates showed a positive result in both tests.

All the isolates that showed resistance to imipenem were tested using E-test for detection of metallo- β -lactamase. Of the 35 isolates tested, 11 showed a positive result.

The PCR for detection of the *bla*_{OXA51} gene was carried out with all the isolates used in this study, and 56% showed a positive result. The *bla*_{OXA51} gene is considered intrinsic to the species *A. baumannii*, and it can be used to identify it. In the Hospital São Lucas, 65% of the isolates were identified as *A. baumannii*. A similar result was found in the Hospital de Clínicas (66%), whereas the Hospital Conceição showed a smaller number of isolates of this species, 37%.

The amplification of the fragments of the *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} genes was carried out with 77 isolates that showed reduced susceptibility to carbapenems, i.e., those isolates that appeared resistant or intermediate in the disk-diffusion antibiogram. None of the isolates carried genes for production of the metallo- β -lactamases tested. The same isolates were tested for the *bla*_{OXA23like} gene and only three isolates showed a positive result. One isolate was identified in wastewater from the Hospital São Lucas and two isolates in wastewater from the Hospital de Clínicas. The three isolates showed loss of susceptibility to all the antibiotics tested. These isolates also carried the *bla*_{OXA-51} gene, and were therefore identified as *A. baumannii*.

When we compared the resistance profile of *A. baumannii* isolates with other *Acinetobacter* species, we observed that the first ones were more resistant for the majority of tested antibiotics (Figure 1). However, this result was not observed among the carbapenems and gentamicin because of 11 isolates from Hospital Conceição that were not identified as *A. baumannii*. They have the same resistance profile and were resistant to gentamicin, meropenem and imipenem, positive in the E-test MBL and negative for the presence of *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23} genes. Because these 11 isolates shared many phenotypic characteristics and were isolated from the same sampling site, they were considered as clones, therefore, three from these 11 isolates had their 16S rDNA fragment sequenced. They all presented the same sequence with 98% identity with *A. junii* 16S rRNA sequences from Genbank.

Discussion

Few studies have been carried out to determine antimicrobial-susceptibility profiles in bacterial isolates obtained from samples of hospital wastewater. Guardabassi *et al.*¹² determined the antimicrobial profile of isolates of *Acinetobacter* sp. from hospital wastewater and a pharmaceutical company, and observed that the incidence of resistance of the isolates from the wastewater, compared to the clinical samples, was generally lower. However, in this study few antimicrobials were tested, and the carbapenems, which are the antimicrobials of choice for treatment of infections caused by *Acinetobacter* spp., were not tested. Even so, it was possible to observe the presence of 2.2% isolates that were resistant to three or more antimicrobials of the six tested. Yang *et al.*,³² in a study comparing the antimicrobial-resistance profile between clinical isolates and isolates from hospital wastewater in Taiwan, concluded that isolates from wastewater showed high rates of microbial resistance, as did the clinical isolates from the same hospital. In our studies, we found 30% multiresistant isolates

in the three hospitals analyzed; this high percentage is indicative of the contribution by the hospital environment. In the Hospital Conceição and the Hospital de Clínicas, where the collections were made at different points inside each hospital, the wastewater from the laundry yielded the largest number of isolates, 50 and 56 respectively. More multiresistant isolates were found at these points than at the other points analyzed.¹⁰

The triage test for production of metallo- β -lactamases was shown to be inefficient for the isolates of *Acinetobacter* spp. tested in this study: several isolates gave positive results but did not carry genes for the production of these enzymes. Comparative studies among phenotypic tests for the detection of metallo- β -lactamases were carried out by Yan *et al.*,³¹ demonstrating that these tests are inefficient for isolates of the genus *Acinetobacter*.

The OXA-51-type enzyme was first found in a clinical isolate in Argentina, but several studies have now revealed that this gene is present in the genus *Acinetobacter* on several continents.²⁷ The OXA-51-type enzyme group includes a large number of variants with the numbers 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 75, 76, 77, 83, 84, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94, and 95. These genes are chromosomal, occur naturally in isolates of *A. baumannii*, and do not appear in other species of this genus.²⁶ For this reason, many studies have used the *bla*_{OXA-51like} gene to identify this species, which is the most common in nosocomial infections caused by the genus *Acinetobacter*. The presence of this gene is not necessarily related to resistance to carbapenems, because it depends on the *ISAbal* gene, which when located above the *bla*_{OXA-51} functions as a promoter of the expression, contributing to increased expression of resistance to carbapenems.¹⁹ According to a study by Vahaboglu *et al.*,²⁷ 77.8% of the clinical isolates analyzed carried the *bla*_{OXA-51} gene, belonging to the species *A. baumannii* and these isolates also showed high rates of antimicrobial resistance.

In this study, more than half of the isolates carried the *bla*_{OXA-51like} gene, indicating a high prevalence of isolates of *A. baumannii* in the hospital wastewater; this is the species that

is most often associated with hospital-acquired infections. Studies have shown that this species, together with *A. calcoaceticus*, *A. genomospecies 3*, and 13TU, which form the so-called *A. baumannii-calcoaceticus* complex, show the highest rates of antimicrobial resistance. In this study, of the 44 isolates that showed decreased susceptibility to carbapenems, 20 were identified as *A. baumannii*; this resistance may be associated with the presence of the *bla*_{OXA-51like} gene. In the other isolates, other mechanisms must be related to resistance. A larger number of multiresistant isolates belonging to the species *A. baumannii* was also observed when comparing with isolates identified as *Acinetobacter* spp. Bratu et al.⁶ showed that in *A. baumannii*, reduced susceptibility to cephalosporins can be associated with efflux pump systems (AdeABC), on the other hand, it is not an important contributor to aminoglycoside resistance. This resistance mechanism also contributes to the intrinsic resistance to many antimicrobial agents, dyes and detergents, chemicals that are often found in hospital wastewater and might explain the high resistance rates among the strains isolated in our study.

We had also identified the species *A. junii* among the multiresistant isolates. In the last few years this species has been described as a rare opportunistic pathogen found in the environment,^{5,15} but Hung et al.¹³ reported it as an emerging pathogen that mainly affects patients with malignancies or invasive procedures and who have had prior antimicrobial therapy. They also observed high rates of resistance to gentamicin but low rates of resistance to carbapenems among the isolates and they emphasized that the increasing antimicrobial resistance among hospital acquired isolates of *A. junii* should be monitored.

According to data from SENTRY, the *bla*_{OXA-23} gene was the one most often found in studies of clinical samples in medical centers in Asia, corresponding to 95% of the Class D genes.¹⁸ In the Military Medical Academy in Bulgaria, clonal dissemination of isolates of *Acinetobacter* sp. with the *bla*_{OXA-23} gene was also observed.²⁴ Dalla Costa et al.,⁸ in a study

in two hospitals in Curitiba, Brazil, found multiresistant OXA-23-producing isolates. Carvalho *et al.*⁷ observed the dissemination of clones of multiresistant strains of *A. baumannii* carriers of the *bla*_{OXA-23like} gene in eight hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Many studies with clinical samples, in various parts of the world, have identified isolates that produce this enzyme. In the hospitals analyzed in this study, strains with the *bla*_{OXA-23like} gene were identified among clinical isolates (data not shown), as well as in isolated from the wastewater from these hospitals. The presence of multiresistant OXA-23-producing strains of *A. baumannii* in wastewater from these hospitals indicates that the pathogenic strains that circulate in the hospital environment can be reaching the wastewater and can therefore enter local waterbodies.

This is the first study to evaluate the dissemination of these resistance genes in hospital wastewater. Although the carbapenem resistance has been attributed to the association of the promoter sequence IS*Aba1*, the results indicate that multiresistant isolates of *A. baumannii* carrying resistance genes such as *bla*_{OXA-51like} and *bla*_{OXA-23like} are being released into the environment through the wastewater of the hospitals analyzed. We also found multiresistant *A. junii* isolates in the hospital wastewater and as they were all negative for the tested genes, they might have another resistance mechanism that should be investigated in the future. Therefore, the hospital wastewater may be a factor in the development and dissemination of multiresistant bacteria and resistance genes into the environment, making the local waterbodies potential reservoirs of bacterial resistance.

Acknowledgments

Our thanks to the Hospital Infection Control Committee from Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital São Lucas and Hospital Conceição, who kindly authorized the collection of the wastewater samples and the publishing of the results and to Dr. Ana Cristina Gales

(Laboratório Alerta and Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Division of Infectious Diseases, Universidade Federal de São Paulo) who kindly provided the strains used as positive controls. This study had the CAPES-PROF financial support.

References

1. Alonso, A., P. Sánchez, and J. Martínez. 2001. Environmental selection of antibiotic resistance genes. Environ. Microbiol. 3:1-9.
2. Arakawa, Y., N. Shibata, K. Shibayama, H. Kurokawa, T. Yagi, H. Fujiwara, and M. Goto. 2000. Convenient test for screening metallo- β -lactamase- producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. J. Clin. Microbiol. 38:40–43.
3. Baquero F., J.L. Martínez, and R. Cantón. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Curr. Opin. Biotechnol. 19:260-265.
4. Bergogne-Berezin, E. and K.J. Towner. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 9: 148-165.
5. Bernardis, A.T., A.J. de Beaufort, L. Dijkshoorn, and C.P.A. van Boven. 1997. Outbreak of septicaemia in neonates caused by *Acinetobacter junii* investigated by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and four typing methods. J. Hosp. Infect. 35:129-140.
6. Bratu, S., D. Landman, D.A. Martin, C. Georgescu, and J. Quale. 2008. 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. Antimicrob. Agents Chemother. 52:2999-3005.
7. Carvalho, K. R., A. P. D. A. C. Assef, G. Peirano, L. C. G. Santos, M. J. F. Pereira, M. D. Asensi, and Baquero, F. 2009. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Intern. J. Antimicrob. Agents 34:25-28.

8. Dalla-Costa, L.M., J.M. Coelho, A.P.H.M. Souza, M.E.S. Castro, C.J.N. Stier, K.L. Bragagnolo, A. Rea-Neto, S.R. Penteado-Filho, D.M. Livermore, and N. Woodford . 2003. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. J. Clin. Microbiol. 41, 3403-3406.
9. Ellington, M.J, J. Kistler, D.M. Livermore, and Woodford, N. 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-b-lactamases. J. of Antimicrob. Chemother. 21:1-2.
10. Ferreira, A. E, G. R. Cunha, D. B. Fuentefria, and Corção, G. 2007. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em cepas de *Acinetobacter* spp. isoladas de efluente hospitalar em Porto Alegre-RS. Caderno de Farmácia 23:9-14.
11. Gales, A.C., M.C.B. Tognim, A.O. Reis, R.N. Jones, and H.S. Sader. 2003. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. Diagnost. Microbiol. Infec. Dis. 45:77-79.
12. Guardabassi, L., A. Petersen, J.E. Olsen, and A. DalDalsgaard. 1998. Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. App. Environ. Microbiol. 64:3499-3502.
13. Hung, Y.T, Y.T. Lee , L.J. Huang , T.L. Chen, K.W. Yu , C.P. Fung , W.L. Cho, C.Y. Liu. 2009. Clinical characteristics of patients with *Acinetobacter junii* infection. J. Microbiol. Immunol. Infect. 42:47-53
14. Joeng, S.H. , I. Kwon Bae, K.O. Park, Y. Jun An, S.G. Sohn, S.J. Jang, K.H. Sung, K.S. Yang, K. Lee, D. Young, and S.H. Lee. 2006. Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. J. Clin. Microbiol. 44:423-431.
15. Kappstein, I., H. Grundmann, T. Hauer, C. Niemeyer. 2000. Aerators as a reservoir of *Acinetobacter junii*: an outbreak of bacteraemia in paediatric oncology patients. J. Hosp. Infect. 44:27-30.

16. Lee, K., Y.S. Lim, D. Yong, J.H. Yum, and Y. Chong. 2003. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. [J. Clin. Microbiol.](#) 41:4623–4629.
17. Linton, K.B., M.B. Richmond, R. Bevan, and W.A. Gillespie. 1974. Antibiotic resistance and R factors in coliform bacilli isolated from hospital and domestic sewage. [J. Medical Microbiol.](#) 7:91-103.
18. Mendes, R.E., J.M. Bell, J.D. Turnidge, M. Castanheira, and R.N. Jones. 2009. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. [J. Antimicrob. Chemother.](#) 63:55-59.
19. Merkier, A.K., and D. Centrón. 2006. bla (OXA-51)-type beta-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. [Int. J. Antimicrob. Agents.](#) 28: 110-113.
20. Misbah, S., H. Hassan, M.Y. Yusof, Y.A. Hanifah, and S. AbuBakar. 2005. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. [Singapore Med. J.](#) 46:461-464.
21. Nordmann, P. and L. Poirel. (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. [Clin. Microbiol. Infect.](#) 8:321-331.
22. Peleg, A.Y. and, D.L. Paterson. 2006. Multidrug-resistant *Acinetobacter*: a threat to the antibiotic era. [Internal. Med. J.](#) 36, 479-482.
23. Sader, H.S., M. Castanheira, R.E. Mendes, M. Toleman, T.R. Walsh, and R.N. Jones, 2005. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. [Intern. J. Antimicrob Agents.](#) 25:57-61.

24. Stoeva, T., P.G. Higgins, E. Savov, R. Markovska, I. Mitov, and H. Seifert. 2009. Nosocomial spread of OXA-23 and OXA-58 b-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian hospital. J. Antim. Chemotherap. 15:1-2.
25. Tognim, M.C.B., A.C. Gales, A.P. Penteadó, S. Silbert, and H. Sader. 2006. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. Infect Control and Hosp Epidemiol. 27:742-747.
26. Turton, J.F., N. Woodford, J. Glover, S. Yarde, M.E. Kaufmann, and T.L. Pitt. 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. J.Clin Microbiol. 44: 2974–2976.
27. Vahaboglu H., F. Budak, M. Kasap, G. Gacar, S. Torol, A. Karadenizli, F. Kolayli, and C. Eroglu. 2006. High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. J Antimicrob Chemother. 58: 537-542.
28. Villegas, M.V. and A.I. Hartstein. 2003. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 24: 284-295.
29. Walsh, T.R., A. Bolmström, A. Qwärnström and A. Gales. 2002. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. J Clin Microbiol. 40:2755-2759.
30. Woodford, N., M.J. Ellington, J.M. Coelho, J.F. Turton, M.E. Ward, S. Brown, S.G. Amyes, and D.M. Livermore. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int. J. Antimicrob. Agents. 27:351-353.
31. Yan, J.J., J.J. Wu, S.H. Tsai, and C.L. Chuang. 2004. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 49: 5-11.

32. Yang, C.M., M.F. Lin, P.C. Liao, H.W. Yen, B.V. Chang, T.K. Tang, C. Chem, C.H. Sung, and M.L. Liou. 2009. Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. Let. Appl. Microbiol. 48:560-565.
33. Yong, D., K. Lee, J.H. Yum, H.B. Shin, G.M. Rossolini, and Y. Chong. 2002. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J. Clin. Microbiol. 40:3798–3801.
34. Zarrilli, R., R. Casillo, A. Di Popolo, M.F. Tripodi, M. Bagattini, S. Cuccurullo, V. Crivaro, E. Ragone, A. Mattei, N. Galdieri, M. Triassi, and R. Utili. 2007. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. Clin Microbiol. Infect. 13:481-489.

List of figures

Table 1: Primers used in the present study for detection of resistant genes of classes B and D of Ambler.

Gene	Sequence of oligonucleotide primer	Annealing temperature	Expected size (bp)	Reference
<i>bla</i> _{OXA-23like}	F1 (5' GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA3')	51°	570	Woodford <i>et al.</i> 2006[31]
	R1 (5' ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT 3')			
<i>bla</i> _{OXA-51like}	F1 (5' TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG3')	53°	353	Woodford <i>et al.</i> 2006[31]
	R1 (5' TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG 3')			
<i>bla</i> _{IMP}	F2 (5' GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C 3')	53°	188	Ellington <i>et al.</i> 2006[9]
	R2 (5' CCA AAC YAC TAS GTT ATC T 3')			
<i>bla</i> _{VIMlike}	F3 (5' GAT GGT GTT TGG TCG CAT A 3')	52°	390	Ellington <i>et al.</i> 2006[9]
	R3 (5' CGA ATG CGC AGC ACC AG 3')			

Table 2: Prevalence of resistance to multiple antibiotics in *Acinetobacter* spp. isolated from the wastewater of three hospitals in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

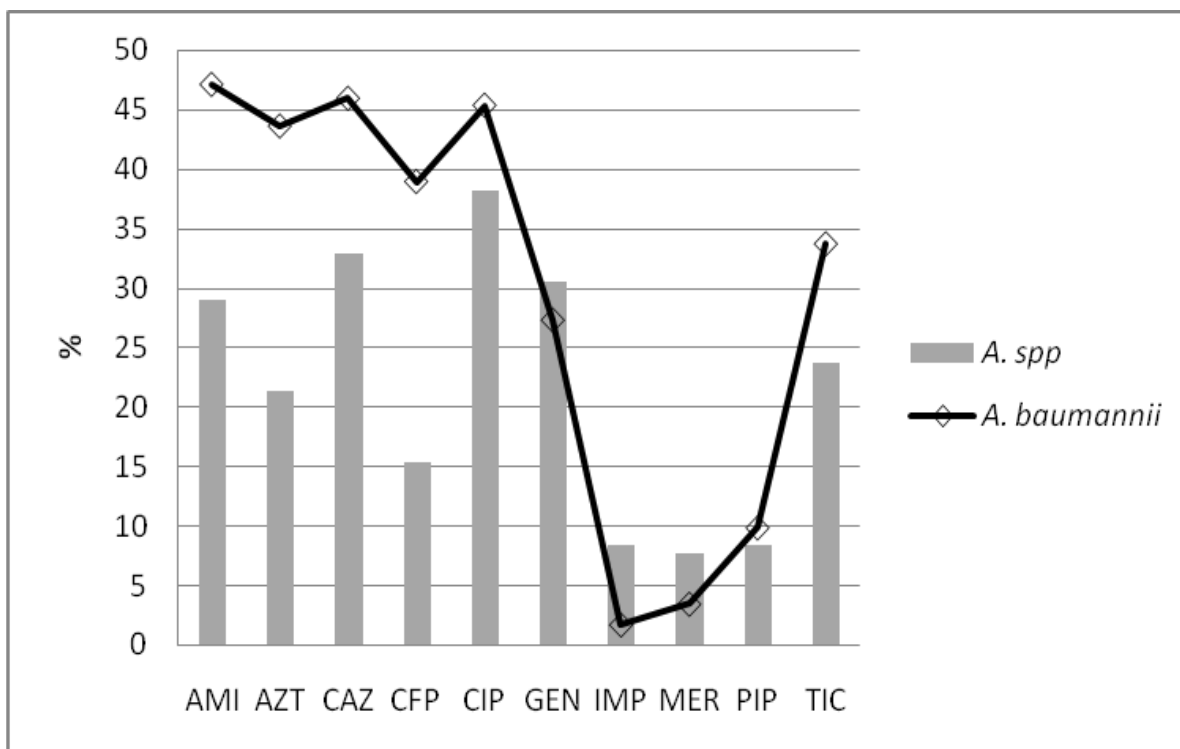
No. of antibiotics	Hospital São Lucas % of isolates	Hospital Conceição % of isolates	Hospital de Clínicas % of isolates
Susceptible to all	67	22	43
Resistant to 1	9	6	7
Resistant to 2	6	12	9
Resistant to 3	1	6	2
Resistant to 4	7	11	2
Resistant to 5	6	4	3
Resistant to 6	7	11	29
Resistant to 7 or more	1	27	6

Table 3: Percentage of susceptibility to antimicrobials of *Acinetobacter* spp. isolated from samples of wastewater from three hospitals in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Antimicrobials	Hospital São Lucas (n=105)			Hospital Conceição (n=97)			Hospital de Clínicas (n=101)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Amikacin	24	14	61	54	10	36	41	6	53
Aztreonam	13	50	36	40	29	31	49	32	20
Ceftazidime	23	11	66	52	7	41	47	15	39
Cefepime	11	11	77	36	7	57	39	7	54
Ciprofloxacin	18	2	80	69	3	28	41	2	57
Gentamicin	20	6	74	57	3	40	10	19	71
Imipenem	1	0	99	11	1	88	2	0	98
Meropenem	3	1	96	11	22	67	2	6	92
PIP	2	3	95	25	15	60	2	18	80
TIC	11	5	84	38	27	35	40	2	58

PIP - Piperacillin-Tazobactam; TIC - Ticarcillin-clavulanic acid; R- resistant; I – intermediate; and S- susceptible.

Figure 1 - Comparison among the resistance profile of *Ac. baumannii* and *Acinetobacter* spp isolated from wastewater samples of Porto Alegre/RS hospitals. AMI- amikacin; AZT – aztreonam; CAZ- ceftazidime; CPM- cefepime; CIP- ciprofloxacin; GEN- gentamicin; IMP- imipenem; MER- meropenem , PIP- piperacillin-tazobactam; TIC - ticarcillin-clavulanic acid



3.3 Artigo 3

Caracterização molecular de isolados clínicos *Acinetobacter* spp. multirresistentes em hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil

Manuscrito a ser submetido para a revista:

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Caracterização molecular de isolados clínicos *Acinetobacter* spp. multirresistentes em hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil

Alessandra Einsfeld Ferreira, Desirée P. Marchetti, Lyvia M. de Oliveira, Daiane B. Fuentefria, Gertrudes Corção

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
Órgãos financiadores: CAPES-PROF e FAPERGS
Endereço para correspondência: Dr^a. Gertrudes Corção. Dept^a de Microbiologia/ICBS/UFRGS. Rua Sarmiento Leite 500, Cidade Baixa, 90050-170 Porto Alegre, RS.
Telefax: 55 51 3308-4111
e-mail: corcao@ufrgs.br

RESUMO

Nos últimos anos hospitais em todo o mundo tem apresentado surtos de *Acinetobacter* spp. multirresistentes. A disseminação destes isolados que apresentam uma variedade cada vez maior de genes de resistência torna mais difícil o tratamento destas infecções e seu controle dentro do ambiente hospitalar. É de grande importância o conhecimento da epidemiologia local dos isolados para que se possa estabelecer o melhor tratamento a ser adotado e as medidas de controle epidemiológico mais adequadas para evitar a disseminação destes microrganismos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de isolados de *Acinetobacter* spp. multirresistentes, avaliar sua disseminação através da tipificação molecular e identificar genes de resistência adquirida. Foram avaliados 274 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. obtidos de cinco hospitais da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, nos anos de 2006 e 2007. Avaliamos o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, buscamos genes de resistência adquirida das classes B e D de Ambler e realizamos a tipificação molecular dos isolados utilizando a técnica de ERIC-PCR. Encontramos uma alta porcentagem de isolados de *Acinetobacter* spp. multirresistentes (68%) e 69% dos isolados apresentaram resistência aos carbapenêmicos. Foram identificados 84% de isolados pertencentes a espécie *A. baumannii*, pois apresentaram o gene *bla*_{OXA-51}. Em 62% dos isolados foi detectado o gene *bla*_{OXA-23} e 61% dos isolados apresentaram os dois genes, sendo que 98% destes isolados são resistentes aos carbapenêmicos. Através da tipificação molecular pela técnica de ERIC-PCR identificamos clones de *Acinetobacter* spp. disseminados entre quatro dos hospitais analisados, também foi encontrado clones destes isolados nos anos de 2006 e 2007, indicando a disseminação destes isolados entre hospitais assim como a permanência destes isolados no ambiente hospitalar.

Palavras chave: *Acinetobacter* spp., disseminação clonal, *bla*_{OXA-23}, ERIC-PCR

O gênero *Acinetobacter* tem ampla distribuição na natureza. São organismos endógenos de vários tipos de solo e água, sendo ocasionalmente encontrados em alimentos.^{1,2}

Nos últimos anos, membros deste grupo, em particular *Acinetobacter baumannii*, têm sido associados à Infecções Associadas à Assistência à Saúde (IAAS) oportunistas principalmente em pacientes debilitados. Os pacientes em unidades de tratamento intensivo e com ventilação mecânica são os de maior risco, além dos queimados. Os principais locais de infecção são o trato respiratório, trato urinário, circulação sanguínea, feridas e queimaduras.³

Segundo trabalho realizado por Jawad *et al.* (1998)⁴, isolados deste gênero podem sobreviver ao dessecamento por períodos prolongados. Esta característica aumenta a incidência de infecções nos hospitais, pois torna estes isolados capazes de permanecer na pele de pacientes, de enfermeiros e médicos assim como em objetos utilizados no ambiente hospitalar por longos períodos.

O tratamento de cepas multirresistentes pode ser complicado. Desde 1970, Infecções Associadas à Assistência à Saúde (IAAS) por *Acinetobacter* spp. foram tratadas com sucesso com aminopenicilinas, ureidopenicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração. Deste então tem se observado um aumento constante da prevalência de cepas resistentes, que tem comprometido o tratamento com penicilinas, aminoglicosídeos, cefalosporinas de espectro estendido, e mais recentemente, fluoroquinolonas.⁵

Carbapenêmicos tem sido a droga de escolha contra infecções por *Acinetobacter* spp., mas o número de isolados resistentes a estes antimicrobianos tem aumentado consideravelmente. Resistência a carbapenêmicos em *A. baumannii* está associada a uma variedade de mecanismos combinados, incluindo aquisição de β -lactamases, desrepressão estável de AmpC, diminuição da permeabilidade da membrana, alteração das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) e superexpressão de bombas de efluxo.

Entre as β -lactamases adquiridas, as enzimas da classe B de Ambler, também chamadas metalo- β -lactamases, e da classe D que hidrolizam carbapenêmicos são as mais identificadas em todo o mundo em cepas de *Acinetobacter* spp. resistentes a carbapenêmicos.^{6,7,8}

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência e disseminação de isolados de *Acinetobacter* sp. multirresistentes portadores de genes de resistência adquirida em cinco hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados bacterianos

Foram coletadas amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. em 5 hospitais de grande porte em Porto Alegre, RS, Brasil. Os isolados foram obtidos juntos aos hospitais após aprovação do projeto junto ao comitê de ética do hospital.

Os hospitais incluídos no estudo foram denominados com as letras de A a E, tendo o Hospital A 897 leitos, 4499 funcionários e 12000 pessoas/dia com uma área de 128.338 m². O Hospital B atende pacientes adultos e pediátricos abrangendo praticamente todas as especialidades, assim como o Hospital A atende pacientes pelo Sistema Único de Saúde (SUS), ele apresenta 603 leitos e circulação de 18.000 pessoas/dia em uma área de 49.000 m². Os hospitais C, D e E fazem parte de um mesmo complexo hospitalar, porém ficam localizados em regiões diferentes da cidade, estes hospitais atendem 100% de pacientes pelo SUS. O Hospital C oferece especialidades de um hospital geral e possui a maior emergência do estado, com 801 leitos e 4631 funcionários em uma área de 43.030 m². O Hospital D atende principalmente vítimas de acidentes de trânsito, acidentes do trabalho, de violência e queimados, apresenta 304 leitos, 1291 funcionários e uma área de 18.835 m². O Hospital E atende emergências ginecológicas e obstétricas, apresenta 189 leitos, 737 funcionários e 12.273 m².

No Hospital A o período de coleta dos isolados foi de fevereiro a abril de 2007 e julho a outubro de 2007. No Hospital B as coletas foram realizadas no mês de julho de 2006 e de julho a outubro de 2007. Os isolados dos Hospitais C, D e E foram obtidos no período de outubro a dezembro de 2006 e de maio a agosto de 2007.

Também foi obtido junto aos hospitais informações sobre o material biológico utilizado para isolamento dos microrganismos e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos.

Identificação dos isolados de *Acinetobacter* sp.

Os isolados foram enviados com identificação prévia pelos laboratórios dos respectivos hospitais, como *Acinetobacter* spp.

A confirmação da identificação foi realizada através da amplificação de um fragmento do 16S rDNA, utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores: Acin16S (5' – CCT TGC GYT AAT AGA TGA GC – 3') e Acin16S (5' –GTA GCA ACC CTT TGT ACC GA - 3') específico para o gênero *Acinetobacter*. Estes oligos foram desenhados pelo alinhamento das seqüências, disponíveis no GENBANK, do 16S de 29 espécies do gênero *Acinetobacter* utilizando o Programa CLC FreeWorkbench 2.2. As reações de amplificação foram realizadas em misturas contendo 3,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 1 µM de cada oligos, 1 unidade de Taq DNA-polimerase, 1x de tampão de reação da Taq DNA-polimerase e 100 ng de DNA bacteriano em um volume final de 30 µL. Foi utilizado um aparelho termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) com as condições de amplificação: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por um minuto e um ciclo final de extensão de 72°C por 8 minutos.

Teste de sensibilidade a antimicrobianos

O perfil de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de *Acinetobacter* spp. foi informado pelos hospitais e foi determinado utilizando a técnica de disco-difusão de acordo com as normas do *Clinical Laboratory Standards Institute*, 2007.⁹ Neste estudo foram utilizados os antimicrobianos testados em comum por todos os hospitais: amicacina (30 µg), ceftazidima (30 µg), piperacilina-tazobactam (100 µg/10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), cefepime (30 µg) e ampicilina/sulbactam (10 µg/10 µg). Os isolados que apresentaram resistência a 4 classes de antimicrobianos foram considerados multirresistentes.

Teste fenotípico para detecção de MBL:

Para triagem fenotípica da produção de metalo-β-lactamase foi realizado o teste de aproximação de discos, utilizando como substratos imipenem e ceftazidima e como inibidores o EDTA e o ácido 2-mercaptopropiônico.^{10,11,12}

Extração de DNA e detecção dos genes *bla*

O DNA dos isolados foi obtido pelo método de fervura segundo Misbah *et al.* (2005).¹³

Os isolados resistentes a imipenem, meropenem e/ou com triagem positiva para produção de metalo-β-lactamase foram submetidos à reação da PCR para pesquisa dos genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}. A pesquisa do gene *bla*_{OXA-51} foi realizada com todos os isolados utilizados neste estudo, pois a identificação da espécie *A. baumannii* foi realizada através da amplificação deste gene. Este gene é encontrado em todos os isolados desta espécie, podendo assim ser utilizada na sua identificação.¹⁴ Para isso, foram utilizados os oligos indicados na Tabela 1. As reações foram realizadas em misturas contendo 1x de Go Taq Master Mix (Promega), 1 µM de cada oligos e 100ng de DNA bacteriano em um volume final de 15 µL. As condições de amplificação foram: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento segundo Tabela1,

extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 6 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

ERIC-PCR

A similaridade genética dos isolados de *Acinetobacter* spp. foi determinada pela Reação em Cadeia das Sequências Intergênicas Repetidas de Enterobactérias (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction*, ERIC-PCR). A reação de amplificação foi realizada com os oligos ERIC1 e ERIC2.¹⁵ A reação de PCR foi realizada em um volume final de 30 µL, contendo 8 µL de DNA genômico, 5,5 mM de MgCl₂, 1,25 mM de cada dNTP, 400 ng de cada oligo e 2 U de Taq DNA-polimerase (Invitrogen). As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 7 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos e, uma extensão final a 72°C por 15 minutos. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 2% acrescido do polímero Synergel (BioAmerica) em Tampão Tris-Borato, corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

Os padrões de bandas obtidos no ERIC-PCR foram convertidos em uma matriz binária considerando 1 para presença da banda e 0 para ausência. A análise dos dados foi realizada no programa SPSS (versão 13) através da análise de agrupamento utilizando o método de média aritmética não ponderada (*unweighted pair-group method with average linkages*-UPGMA) e o coeficiente de *Dice*.

RESULTADOS

Foram analisados 274 isolados de *Acinetobacter* spp. obtidos de cinco hospitais em Porto Alegre, RS, Brasil nos anos de 2006/2007. O Hospital A foi o que apresentou maior número de isolados estudados, com 100 isolados, seguido pelo Hospital C com 93. O Hospital D teve

45 isolados, Hospital B com 32 e o Hospital E com apenas quatro isolados. Foi incluído neste estudo apenas um isolado de cada paciente.

Encontramos 69% de isolados resistentes aos carbapenêmicos. Os hospitais com maiores índices de resistência aos carbapenêmicos são o Hospital C com 87% e o hospital D, com 85%. O Hospital A apresentou 53% dos isolados resistentes aos carbapenêmicos e o Hospital B, com 41%.

Apenas três dos 184 isolados resistentes, apresentaram resistência apenas a um dos carbapenêmicos testados sendo dois isolados resistentes apenas a imipenem e um resistente apenas a meropenem. Analisando os dados de todos os hospitais, os antimicrobianos com maior porcentagem de resistência foram cefepime com 88% e piperacilina-tazobactam com 83%.

O antimicrobiano ampicilina-sulbactam apresentou baixas porcentagens de resistência nos Hospitais A e B com 29% e 55%, respectivamente, ao contrário dos Hospitais C e D que apresentaram as maiores porcentagens de resistência nestes antimicrobianos com 100% e 97%, respectivamente.

No Hospital E foram estudados apenas quatro isolados, sendo estes resistentes a todos os antimicrobianos testados.

Os isolados de *Acinetobacter* spp. foram obtidos de diversas amostras biológicas, sendo o aspirado traqueal o mais freqüente, com 26% dos isolados, seguido por escarro, com 20%. Também foram isolados de amostras de sangue (13%), urina (9%), cateter (8%), secreções (6%) e queimadura (4%). Outras amostras contendo *Acinetobacter* spp. não detalhados no gráfico da Figura 1, devido a sua baixa freqüência, incluem líquido pleural, líquido abdominal, punção lombar, escarras e secreção de ferida operatório. Estas outras amostras correspondem a 14% dos isolados analisados neste estudo. O Hospital D por apresentar um setor de queimados, apresentou sete isolados obtidos a partir de queimaduras.

Analisando os dados obtidos no antibiograma os isolados foram agrupados em 18 perfis distintos com base na resistência aos sete antimicrobianos analisados (Tabela 2). A maior diversidade de perfis foi encontrada no hospital A, com 16 perfis diferentes, sendo que oito destes com apenas um isolado. Analisando os cinco hospitais, o perfil com maior número de isolados foi o de resistência aos sete antimicrobianos, com 61%, seguido pelo perfil de sensibilidade a todos os antimicrobianos, com 12% de isolados. Foram encontrados 68% de isolados multirresistentes, que correspondem aos perfis 1,2,3,4,5,e 7 da Tabela 2.

Foi realizado o teste de triagem fenotípica para a detecção de metalo- β -lactamases através da técnica de aproximação de disco. No teste utilizando como substrato imipenem e como inibidor o EDTA, 10% dos isolados apresentaram resultado positivo, já no teste utilizando meropenem e ácido 2-mercaptopropiônico, a porcentagem de isolados positivos subiu para 21%.

Foi realizado o teste de detecção do gene *bla*_{OXA-51} para todos os isolados analisados neste estudo, foram encontrados 230 (84%) isolados positivos para a presença deste gene. Sendo o hospital com maior número de isolados positivos os hospitais A e C, ambos com 84 isolados. Os quatro isolados analisados do Hospital E apresentaram resultados positivo, o Hospital B apresentou 27 isolados positivos e o Hospital D com 31.

Observamos que os isolados pertencentes a espécie *A. baumannii* apresentaram na sua maioria perfil de multirresistencia. Nos Hospitais A e B, 16 e 3 isolados, respectivamente, não foram identificados como *A. baumannii*, pois foram negativos para o gene *bla*_{OXA-51}. Destes isolados, 14 foram sensíveis aos sete antimicrobianos analisados. Nos hospitais C e D foram encontrados 22 isolados negativos para o gene *bla*_{OXA-51}, porém estes isolados apresentaram comportamento oposto ao encontrado nos outros dois hospitais, pois apenas 2 isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

Com os 214 isolados que apresentaram resistência aos carbapenêmicos e/ou que apresentaram resultado positivo em um dos testes fenotípicos para detecção de metalo-β-lactamase foram realizados ampliações para os genes dos metalo-β-lactamases dos tipos IMP, VIM e SPM. Nenhum dos isolados analisados apresentou resultado positivo para os genes de metalo-β-lactamases, apesar de se ter verificado uma grande porcentagem de isolados positivos nos testes fenotípicos (28%).

Com os mesmos 214 isolados foi realizada amplificação para o gene *bla*_{OXA-23}, sendo encontrado em 61,2% dos isolados. Os quatro isolados do Hospital E apresentaram o gene *bla*_{OXA-23}. O Hospital com maior número de isolados positivos foi o Hospital C com 56 (64%) isolados positivos dos 87 analisados para este hospital. O Hospital B foi o que apresentou menor número de isolados testados, com 12 destes, 8 (62%) apresentaram resultado positivo. O Hospital A apresentou 59% (66 testados) de isolados positivos e o Hospital D com 46,6% (45 testados).

Vinte e um isolados sensíveis aos carbapenêmicos foram avaliados quanto a presença dos genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}, pois apresentaram resultado positivo nos testes de triagem fenotípica para produção de metalo-β-lactamases, destes isolados oito apresentaram os dois genes, sendo três isolados do hospital A, três do hospital D e dois do hospital C. Para a presença dos genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}, 61% dos isolados analisados apresentaram os dois genes.

Para a tipificação molecular através da técnica de ERIC-PCR foram selecionados isolados que apresentaram o gene *bla*_{OXA-23}. Os padrões de bandas encontrados para os isolados de *Acinetobacter* spp. apresentaram alta diversidade, com um número de 4 a 17 fragmentos, variando entre 211 a 1600pb. Os 124 isolados analisados se agruparam em 30 grupos distintos, utilizando 80% como ponto de corte para estabelecer o nível de similaridade entre os isolados. Vinte e cinco isolados apresentaram perfil único. O grupo com maior número de

isolados apresentou nove isolados de *Acinetobacter* spp. pertencentes a quatro hospitais diferentes (um isolado do hospital A, um do hospital B, quatro do hospital C e três do hospital D) e isolados coletados em anos diferentes (cinco isolados de 2006 e quatro de 2007). Assim como este grupo, que apresentou isolados de diferentes hospitais e mantiveram-se no ambiente hospitalar por um longo período de tempo, outros grupamentos apresentaram resultados semelhantes. Foram identificados isolados com 100% de similaridades pertencentes a um mesmo hospital, mas também em diferentes hospitais, como entre hospital A e hospital C (hospital A com um isolado e hospital C com quatro isolados). Em outros grupos foram identificados isolados geneticamente semelhantes pertencentes a hospitais diferentes como: hospital A e B, hospital C e D e hospital A e E.

Esta distribuição dos isolados nos 55 perfis obtidos, nos mostra que os isolados não se agruparam por hospitais, nem por ano de coleta. Também não foi determinada nenhuma relação com os perfis encontrados no antibiograma, pois 80,3% dos isolados pertencia ao perfil 1 (resistência a todos os antimicrobianos testados). Os cinco isolados negativos para o gene *bla*_{OXA-51} ficaram dispersos em perfis diferentes.

DISCUSSÃO

No Brasil assim como em diversas partes do mundo tem se verificado surtos de infecções causadas por bactérias multirresistentes do gênero *Acinetobacter*.

Neste estudo encontramos uma alta porcentagem de isolados de *Acinetobacter* spp. multirresistentes (68%) e resistentes aos carbapenêmicos (69%), que são a melhor opção terapêutica em casos de infecção por este microrganismo. A resistência a antimicrobianos neste gênero é associada a diversos mecanismos, mas a produção de β -lactamases tem sido considerada um dos principais. Maior atenção é dada as β -lactamases localizadas em regiões móveis do DNA bacteriano como plasmídeos e transposons. A transferência horizontal de

genes fornece o mais importante mecanismo para acelerar a dispersão de genes de resistência a antimicrobianos. Em muitas bactérias, especialmente em Gram-negativos, o principal vetor são os plasmídeos. Eles são capazes de transferência de material genético entre isolados da mesma espécie e entre diferentes espécies. Têm uma estrutura em mosaico que surge da recombinação e transposição, que é responsável pela captura de diferentes genes de resistência, dando origem ao fenótipo de multirresistência.¹⁹

Embora *Acinetobacter* spp. seja implicado em uma variedade de Infecções Associadas à Assistência à Saúde (IAAS), incluindo meningites, infecção do trato urinário, infecções cirúrgicas, seu papel predominante é como agente etiológico de pneumonias nosocomias, principalmente em pacientes com pneumonia associada a ventilação mecânica e internados em unidades de tratamento intensivo.²⁰ Este dado corrobora com os obtidos neste estudo com relação ao isolamento de *Acinetobacter* spp. principalmente a partir de aspirado traqueal e escarro. Outros estudos também encontraram resultados semelhantes aos nossos, como Papa et al (2009)²¹ que encontrou 20% dos isolados obtidos a partir de aspirado traqueal, 17% de cultura de sangue e 15% de cateteres. Outro estudo encontrou 32% de isolados obtidos do trato respiratório, 19% de feridas, 19% de urina, 16% de sangue e 13% de cateter.²²

Nosso trabalho encontrou 28% de isolados positivos para o teste de triagem fenotípica para metalo- β -lactamase, sendo que nenhum isolado apresentou os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}. As técnicas de aproximação de disco inicialmente propostas por Arakawa et al (2000)¹⁰ e Lee et al (2003)¹² para bacilos Gram-negativos demonstraram-se inicialmente eficientes para detecção de enzimas metalo- β -lactamases. A medida que esta técnica foi sendo utilizada para *Acinetobacter* spp., estudos demonstraram a baixa especificidade apresentada para este gênero.^{23,24}

O gene *bla*_{OXA-51} tem sido encontrada em todos os isolados de *A. baumannii* testados e esta sendo considerada como um componente natural no cromossomo desta espécie.^{14,25} A

presença deste gene tem sido utilizada para a identificação da espécie *A. baumannii*. Este gene pode estar associado a resistência a carbapenêmicos quando seqüências de inserção do tipo IS*Abal*, carregando promotores fortes, é detectada acima do gene da oxacilinase, resultando no aumento da expressão e concomitante resistência aos carbapenêmicos.²⁶ Em nosso estudo verificamos um grande número de isolados positivos para a presença do gene *bla*_{OXA-51} (84%), resultados semelhante ao encontrado por Wisplinghoff et al. (2000)²⁷ que encontrou 86%. Em muitos estudos a espécie *A. baumannii* tem maior prevalência, sendo mais associada a Infecções Associadas à Assistência à Saúde (IAAS) e também é a espécie que apresenta maiores taxas de resistência a antimicrobianos.^{28,29}

Resistência a carbapenêmicos em isolados de *Acinetobacter* sp. são mais freqüentemente mediados por enzimas do tipo OXA e menos freqüentemente por metalo- β -lactamases.³⁰ Assim como em nosso estudo outros trabalhos tem buscado enzimas do tipo metalo- β -lactamases, porém as enzimas do tipo OXA, como *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-58} são mais freqüentes neste gênero.^{8,31,32}

Estudo também realizado em Porto Alegre, RS, Brasil com *Acinetobacter* spp. analisaram 53 isolados, todos apresentaram genes das enzimas *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}.²⁸ Outro estudo realizado em Curitiba, PR, Brasil com isolados de *A. baumannii* foi detectada a presença do gene *bla*_{OXA-23} em oito isolados resistentes a carbapenêmicos. Também foi verificado que isolados sensíveis aos carbapenêmicos não apresentaram o gene da enzima *bla*_{OXA-23}.³³ Em nosso estudo encontramos oito isolados sensíveis aos carbapenêmicos que apresentaram os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}. As enzimas do tipo OXA exibem uma fraca hidrólise de carbapenêmicos, e podem não apresentar sempre perfil de resistência, porém quando estão associadas a elementos de inserção podem ter um aumento na sua expressão e apresentar resistência aos carbapenêmicos.³⁰

A técnica de ERIC-PCR é um método alternativo, rápido e de baixo custo que apresentou bons resultados para a caracterização genética de isolados de *Acinetobacter* spp.. Através da ERIC-PCR, foram identificados clones de *Acinetobacter* sp. em diferentes hospitais, assim como a permanência de isolados de um ano para outro em um mesmo hospital. Estes dados estão diretamente relacionados às características de disseminação deste microrganismo, de se manter por longos períodos no ambiente hospitalar e à sua principal forma de disseminação, por contato, como a troca de pacientes entre hospitais, como a equipe de médicos, enfermeiros e técnicos dentro do hospital e atuando em diferentes hospitais.

Em trabalho realizado por Jeong et al. (2006)³⁴ utilizando a ERIC-PCR em isolados de *A. baumannii* foram encontrados perfis idênticos para sete isolados produtores de OXA-23 em um hospital da Coreia. Em outro estudo realizado com sete isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23, de um mesmo hospital, foram identificados dois grupos distintos utilizando ERIC-PCR, sendo que um grupo era composto por cinco isolados de perfis idênticos e o outro com dois isolados.⁷

Com a disseminação de isolados multirresistentes e com a diversidade de genes de resistência, a escolha do tratamento adequado se torna cada vez mais difícil. É de grande importância o conhecimento da epidemiologia local dos isolados de *Acinetobacter* spp., uma vez que estudos como este tem demonstrado a disseminação de clones desta espécie em diferentes hospitais, para que seja estabelecido o melhor tratamento a ser adotado e o controle epidemiológico correto evitando a propagação destes microrganismos. Um eficiente controle das medidas de bloqueio como lavagem de mãos, manter os pacientes em isolamento de contato, limpeza adequada de equipamentos e conscientização de toda a equipe técnica são medidas necessárias para reduzir os surtos de infecção por *Acinetobacter* spp..

Em nosso estudo podemos observar, através do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, dos genes de resistência encontrados e pela tipificação molecular, o comportamento dos

isolados entre os diferentes hospitais analisados. Em comum os cinco hospitais apresentaram a disseminação de isolados multirresistentes de *Acinetobacter* sp., resistentes a carbapenêmicos e com os genes das enzimas *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}, provavelmente atuando como os principais responsáveis pela alta taxa de resistência a carbapenêmicos encontradas neste estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos Laboratórios de Microbiologia dos Hospitais Conceição e São Lucas por fornecerem os isolados clínicos utilizados neste trabalho e ao Dr. Afonso Luis Barth por ter cedido os isolados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Agradecemos também a Dr. Ana Cristina Gales (Laboratório Alerta e Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Universidade Federal de São Paulo) por nos disponibilizar as cepas controles positivos para detecção dos genes de resistência deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baumann P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *Journal of bacteriology* 96:39-42, 1968.
2. Bifulco J, Shirey J, Bissonnette G. Detection of *Acinetobacter* spp. in rural drinking water supplies. *Applied Environmental Microbiology* 55:2214-2219, 1989.
3. Karlowsky J, et al. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* an *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998-2001. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 47:1681-1688, 2003.
4. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 36:1938–1941, 1998.
5. Hanlon G. The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. *Letters in Applied Microbiology* 41:375-378, 2005.

7. Sung JY, Kwon KC, Park JW, Kim YS, Kim JM, Shin KS et al. Dissemination of IMP-1 and OXA type β -lactamase in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Korean Journal Lab Med 28:16-23, 2008.
8. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program 63:55-59, 2009.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2007.
10. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fugiwara H, Goto M Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. Journal of Clinical Microbiology 38:40–43, 2000.
11. Yong D, et al. Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo- β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. Journal of Clinical Microbiology 40:3798–3801, 2002.
12. Lee K. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase- Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. Journal of clinical microbiology 41:4623–4629, 2003.
13. Misbah S, et al. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. Singapore Med J. 46:461-464, 2005.
14. Turton J, Woodford N, Gloves J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. Journal of Clinical Microbiology 58,2974-2976, 2006.

15. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.P. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacterial and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19:6823-6831, 1991.
16. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal Antimicrobial Agents* 27:351-353, 2006.
17. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* v.21, p.1-2, 2006.
18. Fuentefria DB, Ferreira AE, Gräf T, Corção G. Spread of metallo- β -lactamases: screening reveals the presence of a *bla*_{SPM-1} gene in hospital sewage in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:82-85, 2009.
19. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64:i3-i10, 2009.
20. Gales AC, Pfaller MA, Sader HS, Hollis RJ, Jones RN. Genotypic characterization of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter* spp. isolated in Latin America 10:286-291, 2004.
21. Papa A, Koulourida V, Souliou E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a newly established Greek Hospital. *Microbial Drug Resistance* 15:257-260, 2009.
22. Abbo A, Navon-Venezia S, Hammer-Muntz O, Krichali T, Siegman-Igra Y, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases* 11:22-29, 2005.
23. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh T, Jones RN Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25:57-61, 2005.

24. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo- β -lactamases in gram-negative bacilli. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 49:5-11, 2004.
25. Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49:4174-4179, 2005.
26. Queenan AM, Bush K. Carbapenamases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 20:440-458, 2007.
27. Wisplinghoff H, Edmond MB, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP, Seifert H. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States Hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. *Clinical Infectious Diseases* 31:690-697, 2000.
28. Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, Machado ABMP, Barth, AI Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection* 37:474-476, 2009.
29. Yang SC, Chang WJ, Chang YH, Tsai YS, Yang TP, Juan CW, Shiau MY. Prevalence of antibiotics resistance and OXA carbapenemases genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in central Taiwan. *Eur Journal Microbiol Infection Disease* 29:601-604, 2010.
30. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65:233-238, 2010.
31. Stoeva T, Higgins PG, Savov E, Markovska R, Mitov I, Seifert H. Nosocomial spread of OXA-23 and OXA-58 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ver volume:1-2, 2009.

32. Mendes RE, Spanu T, Deshpande L, Castanheira M, Jones RN, Fadda G. Clonal dissemination of two clusters of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 or OXA-58 in Rome, Italy. *Clinical Microbiology and Infection* 15:588-592, 2009.
33. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HAPHM, Castro MES, Stier CJN, Bragagnolo KL et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 41:3403-3406, 2003.
34. Jeong, S.H., Bae, I.K., Park, K.O., et al. Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. *The Journal of Microbiology*. v.44, p.423-431, 2006.

Tabela 1 – Oligos utilizados neste estudo para detecção dos genes de resistência das classes B e D de Ambler.

Gene	Seqüência do oligonucleotídeo iniciador	Temperatura de anelamento	Tamanho esperado (pb)	Referência
<i>bla_{OXA-23}</i>	F1 (5' GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA3')	51°	570	Woodford <i>et al.</i> 2006 ¹⁶
	R1 (5' ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT 3')			
<i>bla_{OXA-51}</i>	F1 (5' TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG3')	53°	353	Woodford <i>et al.</i> 2006 ¹⁶
	R1 (5' TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG 3')			
<i>bla_{IMP}</i>	F2 (5'GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C 3')	53°	188	Ellington <i>et al.</i> 2006 ¹⁷
	R2 (5' CCA AAC YAC TAS GTT ATC T 3')			
<i>bla_{VIM}</i>	F3 (5' GAT GGT GTT TGG TCG CAT A 3')	52°	390	Ellington <i>et al.</i> 2006 ¹⁷
	R3 (5' CGA ATG CGC AGC ACC AG 3')			
<i>bla_{SPM}</i>	F (5'TCG GAT CAT GTC GAC TTG CC -3')	53°	344	Fuentefria et al. 2009 ¹⁸
	R (5'CCT TCG CTT CAG ATC CTC GT - 3')			

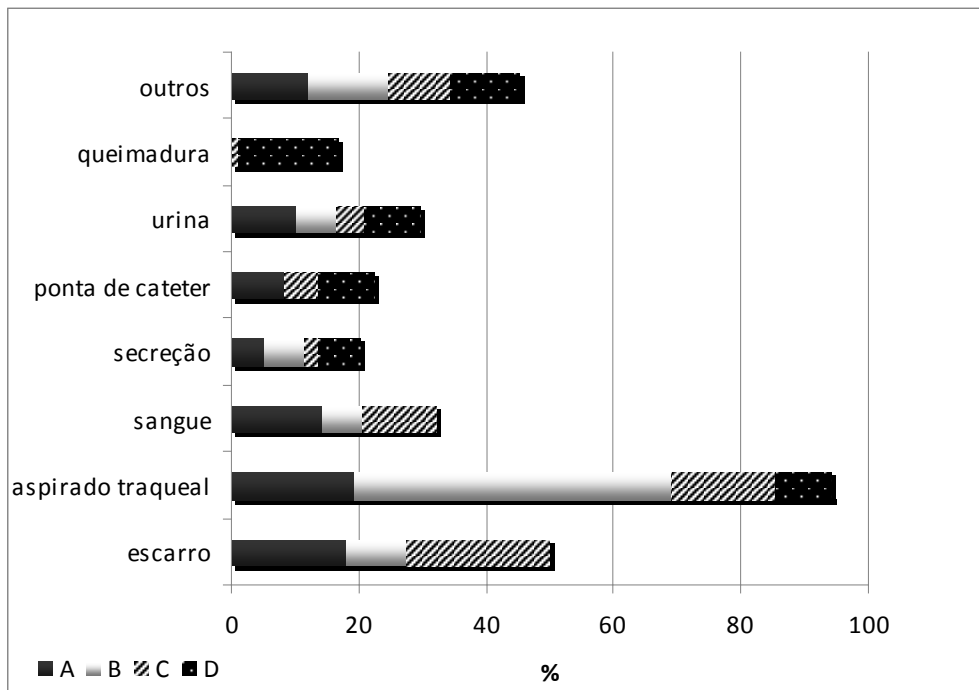


Figura 1 – Gráfico indicando a porcentagem de isolados correspondente a cada material biológico utilizado para isolamento de *Acinetobacter* spp. em cada hospital estudado (A, B, C e D).

Tabela 2 – Perfis de perda de suscetibilidade a antimicrobianos encontrados nos 5 hospitais avaliados, com o número de isolados identificados para cada perfil em cada hospital.

PERFIL	ANTIMICROBIANOS	HOSPITAIS				
		A	B	C	D	E
1	AMI AMP CFP CAZ IMP MER PIP	43	13	73	33	4
2	AMI CFP CAZ IMP MER PIP	5				
3	AMI AMP CFP IMP MER PIP	2		3	5	
4	AMI AMP CFP CAZ IMP PIP	1				
5	AMP CFP CAZ IMP MER PIP			3		
6	AMI AMP CFP CAZ PIP	8	3	6	5	
7	AMP CFP IMP MER PIP	1				
8	AMP CFP CAZ PIP	1				
9	AMI CFP CAZ PIP	9	9			
10	AMI CFP CAZ MER	1				
11	AMI CAZ PIP	1				
12	CFP CAZ PIP	1	1			
13	AMI CFP CAZ	2				
14	AMI CFP	1				
15	AMI	2		1		
16	CAZ	1				
17	AMP		1			
18	SENSÍVEL A TODOS	21	5	4	2	

AMI- amicacina; AMP- ampicilina-sulbactam; CFP – cefepime; CAZ- ceftazidima; IMP- imipenem; MER- meropenem; PIP – piperacilina tazobactam.

3.4 Artigo 4

Disseminação de *Acinetobacter* spp. multirresistente carreadores do gene *bla*_{OXA-23} em hospitais e efluentes hospitalares em Porto Alegre, RS, Brasil.

Manuscrito a ser submetido para revista:

Research in Microbiology

Disseminação de *Acinetobacter* spp. multirresistente carreadores do gene *bla*_{OXA-23} em hospitais e efluentes hospitalares em Porto Alegre, RS, Brasil.

Alessandra Einsfeld Ferreira¹, Desirée P. Marchetti¹, Natalia Canal¹, Daiane B. Fuentefria¹, Gertrudes Corção¹

1. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Órgãos financiadores: CAPES-PROF e FAPERGS

Endereço para correspondência: Dr^a. Gertrudes Corção. Dept^o de Microbiologia/ICBS/UFRGS. Rua Sarmiento Leite 500, Cidade Baixa, 90050-170 Porto Alegre, RS.

Telefax: 55 51 3308-4111

e-mail: corcao@ufrgs.br

Resumo

Surtos causados pela disseminação de clones de *Acinetobacter* spp. multirresistentes e carreadores de genes de resistência têm sido registrado em várias partes do mundo e têm causado grande preocupação. O estudo epidemiológico destes surtos é de grande importância para detectar as fontes de disseminação destes microorganismos e com isso tentar diminuir o número de infecções. Este trabalho teve como objetivo avaliar a disseminação clonal de isolados de *Acinetobacter* spp. multirresistentes e carreadores do gene *bla*_{OXA-23} entre hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil e para o meio ambiente através do efluente hospitalar. Ao todo 125 isolados clínicos coletados nos anos de 2006 e 2007 em cinco hospitais de Porto Alegre, e seis isolados de efluente hospitalar, foram analisados através das técnicas de amplificação de seqüências repetitivas do genoma (ERIC-PCR) e a análise de macrorestrição do genoma (PFGE). Foi encontrado um clone predominante disseminado em quatro dos cinco hospitais analisados e que se manteve no ambiente hospitalar durante o período deste estudo. Também pode se verificar a relação genética dos isolados encontrados no efluente com os isolados clínicos, indicando que o efluente destes hospitais está participando na disseminação destes microorganismos multirresistentes e carreadores de genes de resistência para o meio ambiente.

Palavras-chave: *Acinetobacter* spp., *bla*_{OXA-23}, efluente hospitalar, ERIC-PCR, PFGE.

1. Introdução

O gênero *Acinetobacter* tem emergido como um importante patógeno nosocomial devido a sua habilidade em sobreviver no ambiente hospitalar por longos períodos, facilitando sua dispersão e causando surtos em hospitais de várias partes do mundo.¹⁴ Esta característica o torna capaz de permanecer na pele de pacientes, de enfermeiros e médicos assim como em objetos utilizados no ambiente hospitalar, aumentando a incidência de infecções.⁹

Dados do SENTRY mostram um aumento na resistência a carbapenêmicos neste gênero, sendo este o antimicrobiano de escolha para tratamento destas infecções.^{6,18} O mecanismo mais comum de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos é a presença de β -lactamases, as quais são codificadas pelo cromossomo ou carregadas por elementos genéticos móveis como plasmídeos, integrons ou transposons. Maior atenção tem sido destinada ao surgimento de cepas resistentes aos carbapenêmicos por β -lactamases adquiridas, como as metalo- β -lactamases ou oxacilinases, sendo o segundo grupo mais freqüente no gênero *Acinetobacter*.²⁴

No gênero *Acinetobacter* já foram identificadas as enzimas oxacilinases da classe D de Ambler dos sub-grupos: OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58.⁸ No Brasil estudos tem observado a disseminação de isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes e portadores do gene da carbapenemase *bla*_{OXA-23}.^{3,13} O primeiro relato da enzima OXA-23 em *A. baumannii* no Brasil foi em trabalho realizado por Dalla-Costa et al. (2003)⁴ que descreveu um surto na cidade de Curitiba.

Sabe-se que ambientes fortemente seletivos, como o ambiente hospitalar, podem levar a um aumento da frequência de bactérias resistentes a antimicrobianos, e estas podem ser liberadas no ambiente através do efluente hospitalar.^{4,16}

Uma importante parte da dispersão e evolução de bactérias resistentes a antimicrobianos depende do ambiente aquático. Na água, bactérias de diferentes origens (humana, animal, ambiental) se encontram e a resistência evolui como consequência de trocas de genes. Ao mesmo tempo antimicrobianos, desinfetantes e metais pesados lançados na água, podem exercer uma atividade seletiva, bem como um dano ecológico às comunidades deste ambiente aquático, resultando em mais resistência a antimicrobianos.²

Há mais de três décadas, estudos demonstram que efluentes hospitalares apresentam níveis mais elevados de bactérias entéricas resistentes a antimicrobianos do que efluentes derivados de outras fontes e, que a concentração de antimicrobianos na água que recebe o efluente hospitalar também é superior, criando um ambiente com forte pressão seletiva.¹¹

O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação clonal de isolados de *Acinetobacter* spp. multirresistentes e *bla*_{OXA-23} positivos obtidos em cinco hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil, assim como a disseminação destes isolados para o meio ambiente através do efluente hospitalar, utilizando ERIC-PCR e PFGE para caracterização molecular destes isolados.

2. Materiais e Métodos:

2.1 Isolados analisados

Neste estudo foram utilizados isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. coletadas em cinco hospitais de grande porte em Porto Alegre, RS, Brasil e isolados de amostras de efluente de três destes hospitais. Os hospitais incluídos no estudo foram denominados com as letras de A a E e os isolados receberam as letras correspondentes ao seu hospital de origem.

Foram realizadas duas coletas de efluente hospitalar em cada hospital. No Hospital A a coleta foi realizada no mês de março de 2007 e em agosto de 2007, no Hospital B as coletas foram realizadas no mês de julho de 2006 e agosto de 2007 e no Hospitais C as coletas foram em novembro de 2006 e julho de 2007. Os isolados clínicos foram obtidos junto aos laboratórios de análises clínicas de cada hospital na mesma época da coleta dos efluentes, no período de 45 dias antes até 45 dias após as coletas de efluente.

2.2 Isolamento de Acinetobacter spp. de amostras de efluente hospitalar

Foram coletadas amostras de 1 litro do efluente hospitalar e 100 mL foram filtradas em membranas de ésteres mistos de 0,45 µm de porosidade. As membranas foram transferidas para tubos com 10 mL de água peptonada. Após a suspensão do filtro no tubo, foram realizadas diluições seriadas deste e alíquotas de 100µL de cada diluição foram semeadas em placas de ágar MacConkey. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e após incubação foram selecionadas as colônias lactose negativa. Também foram realizadas colorações de Gram e as provas bioquímicas de oxidase e TSI para identificação do gênero *Acinetobacter*.

A confirmação do gênero foi realizada através da amplificação de um fragmento do 16S rDNA, utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores: Acin16S (5' – CCT TGC GYT AAT AGA TGA GC – 3') e Acin16S (5' –GTA GCA ACC CTT TGT ACC GA - 3') específico para o gênero *Acinetobacter*. Estes *oligos* foram desenhados utilizando o alinhamento das seqüências, disponíveis no GENBANK, do gene 16S rRNA de 29 espécies do gênero *Acinetobacter*, utilizando o Programa CLC FreeWorkbench 2.2. As reações de amplificação foram realizadas em misturas contendo 3,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 1 μM de cada *oligos*, 1 unidade de Taq polimerase, 1X de tampão de reação da Taq polimerase e 100 ng de DNA bacteriano em um volume final de 30 μL. Foi utilizado um aparelho termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) com as condições de amplificação: um ciclo inicial de desnaturação a 95° C por 5 minutos, seguido de 25 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.

2.3 Extração de DNA e detecção dos genes *bla*_{OXA-23}

O DNA dos isolados foi obtido pelo método de fervura segundo Misbah et al. (2005).¹⁵ Foram utilizados os *oligos* segundo Woodford et al. (2006)²⁶ para detecção do gene *bla*_{OXA-23}. As reações foram realizadas em misturas contendo 1x de Go Taq Master Mix (Promega), 1 μM de cada *oligos* e 100ng de DNA bacteriano em um volume final de 15 μL. As condições de amplificação foram: um ciclo inicial de desnaturação a 94° C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94° C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 51° C por 1 minuto, extensão a 72° C por 1 minuto e uma extensão final a 72° C por 6 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

2.4 Tipificação Molecular dos isolados de *Acinetobacter bla*_{OXA-23} positivos

2.4.1. ERIC-PCR

A similaridade genética dos isolados de *Acinetobacter* spp. foi determinada pela Reação em Cadeia das Sequências Intergênicas Repetidas de Enterobactérias (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction*, ERIC-PCR). A reação de amplificação foi realizada com os *oligos* ERIC1 e ERIC2.²⁵ A reação de PCR foi realizada em um volume final de 30 µL, contendo 8 µL de DNA genômico, 5,5 mM de MgCl₂, 1,25 mM de cada dNTP, 400 ng de cada *oligos* e 2 U de Taq DNA-polimerase (Invitrogen). As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 7 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos e, uma extensão final a 72°C por 15 minutos. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 2% acrescido do polímero Synergel (BioAmerica) em Tampão Tris-Borato, corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

2.4.2. PFGE

Isolados com similaridade superior a 80% pela técnica de ERIC-PCR foram considerados do mesmo grupo e um representante de cada grupo encontrado foi selecionado para realização da técnica de PFGE. Para a preparação do DNA cromossomal foi utilizado o protocolo proposto por Schwarz e Liebisch (1994).¹⁹ O DNA foi clivado utilizando 30U da enzima *Sma*I, seguindo as recomendações do fabricante (BioLabs). Os fragmentos foram separados em gel de agarose 1,2% (BioRad), utilizando Tampão TBE (Tris-borato-EDTA) 0,5%. O equipamento utilizado foi o sistema CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories), com programa dividido em dois

blocos, no bloco 1, pulsos de 5 a 12 por 10 horas e no bloco 2 pulsos de 20 a 30 por 14 horas, utilizando 6 Vcm^{-1} . O gel foi corado com brometo de etídeo e analisado com o auxílio de um transluminador ultravioleta e fotografado com câmera digital Kodak 1D (versão 3.5.2). Foi utilizado marcador molecular DNA Ladder 100 (Biolabs) para determinação do tamanho das bandas.

2.4.3. Análise dos dados

Os padrões de bandas obtidos no ERIC-PCR e no P FGE foram convertidos em uma matriz binária considerando 1 para presença da banda e 0 para ausência. A análise dos dados foi realizada no programa SPSS (versão 13) através da análise de agrupamento utilizando o método de média aritmética não ponderada (*unweighted pair-group method with average linkages-UPGMA*) e o coeficiente de similaridade de *Dice*.

3. Resultados e discussão

Neste estudo foram utilizados 124 isolados clínicos coletados em cinco hospitais de Porto Alegre, nos anos de 2006 e 2007, todos isolados apresentam perfil de multirresistência a antimicrobianos e o gene da enzima *bla*_{OXA-23}. Foram analisados 36 isolados do hospital A, sete do hospital B, 55 do hospital C, 23 do hospital D e três do hospital E. Foram utilizados neste estudo três isolados de *Acinetobacter* spp. multirresistentes de amostra de efluente hospitalar que apresentaram o gene *bla*_{OXA-23}. Também foram incluídos nas análises 4 isolados sensíveis a antimicrobianos e que não apresentam o gene da enzima *bla*_{OXA-23}, sendo um de amostra clínica (A75) e três de efluente hospitalar (AE57, BE17 e BE4).

A técnica de ERIC-PCR apresentou uma grande diversidade de perfis para os isolados de *Acinetobacter* spp. O tamanho dos fragmentos obtidos variou de 211 a 1600 pb e o número de fragmentos encontrados foi de 4 a 17 por isolado. Foram encontrados 38 grupos distintos, com similaridade maior que 80% e 19 isolados com perfil único. A maioria dos grupos formados, foram constituídos de dois e três isolados e os maiores grupos formados foram três grupos com sete isolados (perfis 32, 42 e 48) e dois grupos com seis isolados (perfis 5 e 6) (Tabela 1).

A maioria dos grupos gerados no dendograma pela técnica de ERIC-PCR apresentaram isolados de diferentes hospitais e dos dois anos de coleta analisados, porém os grupos dos perfis 10, 12, 23, 34 e 41 são formados por isolados apenas do hospital C, nos grupos dos perfis 34 e 41 os isolados eram todos do ano de 2007. Assim como os grupos dos perfis 24 e 40, compostos apenas por isolados do hospital A, todos coletados em 2007.

Os grupos dos perfis 32 e 42 apresentaram sete isolados, sendo estes de quatro dos cinco hospitais estudados. No perfil 32, dois isolados do hospital C foram coletados no ano de 2006 e apresentaram perfil idêntico e os outros isolados, incluindo mais um do hospital C, foram coletados em 2007. No perfil 42 cinco isolados foram coletados no ano de 2006, sendo de dois hospitais diferentes, e os outros dois em 2007. O perfil 48 agrupou sete isolados de três hospitais, todos coletados no ano de 2007.

Foram identificados isolados do mesmo hospital, com perfis idênticos através da técnica de ERIC-PCR, como os isolados A53 e A54; A52, A40 e A46; C298 e C295; C158 e C173; C136 e C178. Também foram identificados isolados com perfis idênticos em hospitais diferentes como: A75 e B259; C316 e D327; A237 e E293; A174 e C172 (Tabela 1). Estes dados indicam a permanência de isolados endêmicos de *Acinetobacter* spp. nos hospitais analisados, assim como a disseminação destes isolados entre os diferentes hospitais da cidade.

Dos três isolados do efluente hospitalar multirresistentes e que apresentaram o gene *bla*_{OXA-23} analisados (CE6, CE17 e BE117), dois pertencentes ao hospital C, apresentaram perfil idêntico e 81% de similaridade com os isolados clínicos C149 e D186 (perfil 44), indicando a disseminação de amostras clínicas através do efluente hospitalar.

Entre os isolados tipificados por ERIC-PCR, foram selecionados aleatoriamente um isolado de cada um dos principais grupos formados para análise pela PFGE. Um total de 48 isolados foram analisados, 45 clínicos e 3 de efluente hospitalar, sendo que um clínico e um de efluente eram sensíveis a antimicrobianos e negativo para o gene *bla*_{OXA-23}.

O número de fragmentos gerados no PFGE utilizando a enzima *Sma*I foi de 5 a 11, variando de 190 a 745pb. Foram encontrados 15 grupos (Figura 1), sendo um subgrupo Ia com apenas uma banda de diferença do grupo I, segundo a definição de Tenover et al. (1995)²³ os isolados pertencentes a estes grupos podem ser considerados clones. Os perfis I e Ia, agrupados com 93% de similaridade e contendo 48% dos isolados analisados, apresentaram isolados com 100% de similaridade (Figura 2) em cada grupo. Nestes grupos encontram-se isolados de quatro dos cinco hospitais analisados, sendo que do quinto hospital (E) apenas um isolado foi analisado. O grupo I obtido no PFGE agrupou 11 perfis distintos (27 isolados) encontrados pela ERIC-PCR e o grupo Ia também agrupou 11 perfis (28 isolados). Pode-se observar que no grupo I (I e Ia) estão os clones predominantes nos hospitais B, C e D nos anos de 2006 e 2007.

Outros estudos no Brasil e em várias partes do mundo tem demonstrado que infecções causadas pelo gênero *Acinetobacter* caracterizam-se pela dispersão de clones dentro de um hospital e entre hospitais^{13,14,21}, assim como a ocorrência de surtos pelo mesmo clone ao longo dos anos.²⁰

O grupo III foi formado por quatro isolados do hospital A todos obtidos nos meses de abril e maio de 2007, indicando a disseminação de um clone co-existindo com o clone do grupo Ia, representado pelos isolados A52 e A79 que também foram obtidos em abril de 2007. Os perfis obtidos no PFGE para os grupos Ia e III apresentaram seis bandas de diferença e segundo critérios de Tenover (1995)²³, estes isolados podem ser considerados relacionados.

O grupo IV é composto por dois isolados, sendo um isolado clínico e um isolado de efluente hospitalar, ambos do hospital A, agrupados com 100% de similaridade. Os grupos VI e X são compostos por 2 isolados de hospitais diferentes

que apresentaram 100% de similaridade cada, os isolados do grupo VI são de 2007 e os do grupo X de 2006. O grupo clonal IX é formado por isolados de três hospitais diferentes todos obtidos no ano de 2007 (Tabela 1 e Figura 2).

Comparando os resultados obtidos nas duas técnicas, 4 perfis mantiveram-se iguais nas duas metodologias, os isolados multirresistentes e com o gene *bla*_{OXA-23} (perfis VII e VIII) e os isolados sensíveis a antimicrobianos e negativos para o gene *bla*_{OXA-23} um isolado clínico (perfil XIII) e o perfil XI com um isolado de efluente (Tabela1).

O resultado encontrado para o isolado de efluente BE117, que formou um grupo único (V), com similaridade menor que 80% com os outros isolados, se manteve nas duas técnicas. No perfil obtido na técnica de PFGE o perfil V apresentou três bandas diferentes em relação ao perfil X e 5 bandas diferentes em relação ao perfil I, indicando, segundo critérios de Tenover et al. (1995)²³, que são isolados possivelmente relacionados, demonstrando uma possível origem clínica do isolado.

Onze perfis obtidos pela técnica de ERIC-PCR (perfis 4,9,17, 35, 38, 39, 43, 45, 50, 52, 53) não foram tipificáveis pela técnica de PFGE.

Apesar da técnica de PFGE ter apresentado uma menor diversidade de perfis e ter agrupado os diferentes isolados analisados, ambas as técnicas indicaram uma possível disseminação de isolados clones entre os diferentes hospitais analisados, assim como uma similaridade genética entre isolados de efluente hospitalar e isolados clínicos, indicando sua disseminação através do efluente. Outros trabalhos utilizando esta técnica com o gênero *Acinetobacter* também encontraram a disseminação de clones em diferentes pacientes dentro do hospital.^{10,22}

Este estudo demonstra o potencial epidêmico do gênero *Acinetobacter* e também a capacidade de um isolado clone se manter no ambiente hospitalar por mais de um ano. A capacidade deste gênero de se manter no ambiente hospitalar em objetos e equipamentos, assim como na pele de pacientes, equipe de médicos e enfermeiros já foi constatada em outros estudos.^{5,12} Os dados que nós encontramos confirmam esta habilidade e demonstram a necessidade de maior preocupação com medidas de prevenção e controle no ambiente hospitalar e com a equipe técnica, com o objetivo de diminuir a disseminação destes microrganismos entre pacientes em um mesmo hospital e entre hospitais.

O hospital é considerado um ambiente fortemente seletivo sobre os microrganismos, contribuindo para o aumento da frequência de bactérias resistentes a antimicrobianos.⁷ Porém o meio ambiente também exerce uma pressão seletiva sobre os microrganismos, um exemplo são os patógenos oportunistas *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacea* que apresentam resistência intrínseca a antimicrobianos.¹ Outro fator a ser considerado é o impacto causado pelo efluente não tratado, que apresenta grande quantidade de desinfetantes, metais pesados e antimicrobianos e também criam um ambiente seletivo.²

Segundo Queenan e Bush (2007)¹⁷ é provável que a circulação de genes de resistência ocorra em duas direções: fontes ambientais fornecendo material genético como fonte de enzimas de resistência e as cepas clínicas através da dispersão desta informação tanto no ambiente hospitalar como para o meio ambiente.

O efluente hospitalar contribui diretamente para esta dispersão. A aquisição e dispersão de determinantes de resistência a antimicrobianos entre populações de bactérias virulentas é um problema de grande relevância.¹ Com os dados obtidos neste estudo constatamos a presença de isolados de *Acinetobacter* spp.

multirressitentes carreadores de genes de resistência no efluente de dois hospitais, e similaridade genética com isolados clínicos. Estes efluentes podem estar atuando na seleção e dispersão destes microrganismos, assim como de genes de resistência a antimicrobianos para o meio ambiente.

Agradecimentos

Agradecemos aos Laboratórios de Microbiologia dos Hospitais Conceição e São Lucas por fornecerem os isolados clínicos utilizados neste trabalho e ao Dr. Luis Afonso Barth por ter cedido os isolados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Agradecemos também a Dr. Marisa Cardoso, do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, que nos emprestou o equipamento para realização da técnica de PFGE.

Referências bibliográfica

1. ALONSO, A., SANCHEZ, P. and MARTINEZ, J.L.(2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*. 3, 1-9.
2. BAQUERO F., J.L. MARTÍNEZ, AND R. CANTÓN. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 260-265.
3. CARVALHO, K. R., A. P. D. A. C. ASSEF, G. PEIRANO et al. (2009) Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla_{OXA-23}* collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Intern. J. Antimicrob. Agents*. 34, 25-28.
4. DALLA-COSTA, L.M., J.M. COELHO, A.P.H.M. SOUZA, et al. (2003) Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 41, 3403-3406.
5. DENTON, M., WILCOX, M.H., PARNELL, P. et al. (2005) Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of *Acinetobacter baumannii* on a neurosurgical intensive care unit. *Intensive Crit Care Nurs*. 21, 94-8.
6. FRITSCHÉ, T. R. et al. Emerging Metallo- β -Lactamase-Mediated Resistances: A Summary Report from the Worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clinical Infectious Diseases*. 41suplemento, 276–278, 2005.

7. GOÑI-URRIZA, M., CAPDEPUY, M., ARPIN, C., et al. (2000) Impacto na ur ban effluent on a ntibiotic resistance of riveverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. *Environ Microbiol.* 66,125-132.
8. HIGGINS, P.G., DAMMHAYN, C., HACKEL, M., et al. (2010) Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J ournal of Antimicrobial Chemotherapy.* 65, 233-238.
9. JAWAD, A. et al. (1998) Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates. *Journal Of Clinical Microbiology.* 36, 1938–1941.
10. JEONG, S.H., BAE, I.K., PARK, K.O., et al. (2006) Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. *The Journal of Microbiology.* 44, 423-431.
11. LINTON, K.B., M.B. RICHMOND, R. BEVAN, et al. (1974) Antibiotic resistance and R factors in coliform bacilli isolated from hospital and domestic sewage. *J. Medical Microbiol.* 7, 91-103.
12. MARAGAKIS, L. and PERL, T.M. (2008) *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Antimicrobial Resistance.* 46, 1254-1263.

13. MARTINS, A.F., KUCHENBECKER, R., SUKIENNIK, T., et al. (2009) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection*. 37, 474-476.
14. MENDES, R.E., SPANU, T., DESHPANDE, L., et al. (2009) Clonal dissemination of two cluster of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 or OXA-58 in Rome Italy. *Clinical Microbiology and Infection*. 15, 588-592.
15. MISBAH, S., H. HASSAN, M.Y. YUSOF, Y.A. HANIFAH, AND S. ABUBAKAR. 2005. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. *Singapore Med. J.* 46:461-464.
16. PRADO T., PEREIRA W. C., SILVA D. M. et al. (2008) Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge os a hospital sewage treatment plant. *Letters in Applied Microbiology*. 46, 136-141.
17. QUEENAN, A.M., BUSH, K. (2007) Carbapenemases: Versatili β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 20, 440-458.
18. SADER et al., (2005) Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 25,.57-61.

19. SCHWARZ S. & LIEBISCH B. (1994) Pulsed-field gel electrophoretic identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live vaccine strain Zoosaloral. H. Lett Appl Microbiol. 19:469-472.
20. STOEVA, T., HIGGINS, P.G., BOJKOVA, K., et al. (2008) Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in Bulgarian university hospital. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 14, 716-730.
21. STOEVA, T., HIGGINS, P.G., SAVOV, E., et al. (2009) Nasocomial spread of OXA-23 and OXA-58 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in Bulgarian hospital. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1-2.
22. SUNG ,J.Y., KWON, K.C., PARK, .J.W., et al. (2008) Dissemination of IMP-1 and OXA type β -lactamase in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Korean Journal Lab Med. 28, 16-23.
23. TENOVER, F.C., ARBEIT, R.D., GOERING, R.V., et al. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. Journal Clinical Microbiology. 33, 2233-2239.
24. TURTON, J. et al. (2004) A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in southeast England. J. Hosp Infect. 58, 170-179.

25. VERSALOVIC J., KOEUTH T., LUPSKI J.P. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacterial and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19, 6823-6831, 1991.

26. WOODFORD N, ELLINGTON MJ, COELHO JM, et al (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal Antimicrobial Agents*. 27, 351-353.

Tabela 1 – Grupos formados pela tipificação molecular de isolados clínicos e de efluente hospitalar de *Acinetobacter* spp. utilizando as técnicas de PFGE e ERIC-PCR. Os isolados em negrito correspondem aos isolados de cada grupo formado no ERIC-PCR que foi utilizado na técnica de PFGE.

Perfil PFGE	Perfil ERIC-PCR	ISOLADOS							
I	3	C316*	D325	D327*					
	8	D285							
	11	C310	D308						
	12	C304	C312						
	13	D147							
	19	C322	D289	D290					
	20	C318							
	23	C307	C313						
	27	B266							
	33	A21	A33	C174* C172*					
42	A239	B265	C287	C311	D291	D297		D300	
Ia	5	A40*	A46*	A52*	A53**	A54**	D294		
	6	A63	A70	A71	A72	A79		C317	
	10	C153	C320						
	25	D98	D299						
	26	C144							
	28	C184							
	30	B261	C167						
	31	C185	D125						
	41	C86	C152	C201					
	47	A230	C170						
II	18	D292							
	22	C90							
	32	B275	C83	C204	C295*		C298*	D135	E99
	48	A16	C136*	C165	C166	C178*	C183		D145
III	21	A81							
	49	A69							
	55	A57							
	56	A32							
IV	16	A211	A245	D303					
	44	C149	D186	AE6		AE17			
V	54	BE117							
VI	7	D115							
	34	C85	C158*	C173*					
VII	14	D288							
VIII	46	C286							
IX	36	A49	D161						
	37	C87	D105						
	40	A242	A243						
X	15	A237	C305	E293					
	29	B267	D301	E315					
XI	51	AE57							
XII	1	A75*	B259*						
XIII	2	A35							
XIV	24	A20	A40A	A216		A244			

*, ** Isolados que apresentaram perfil de bandas idêntico em cada grupo.

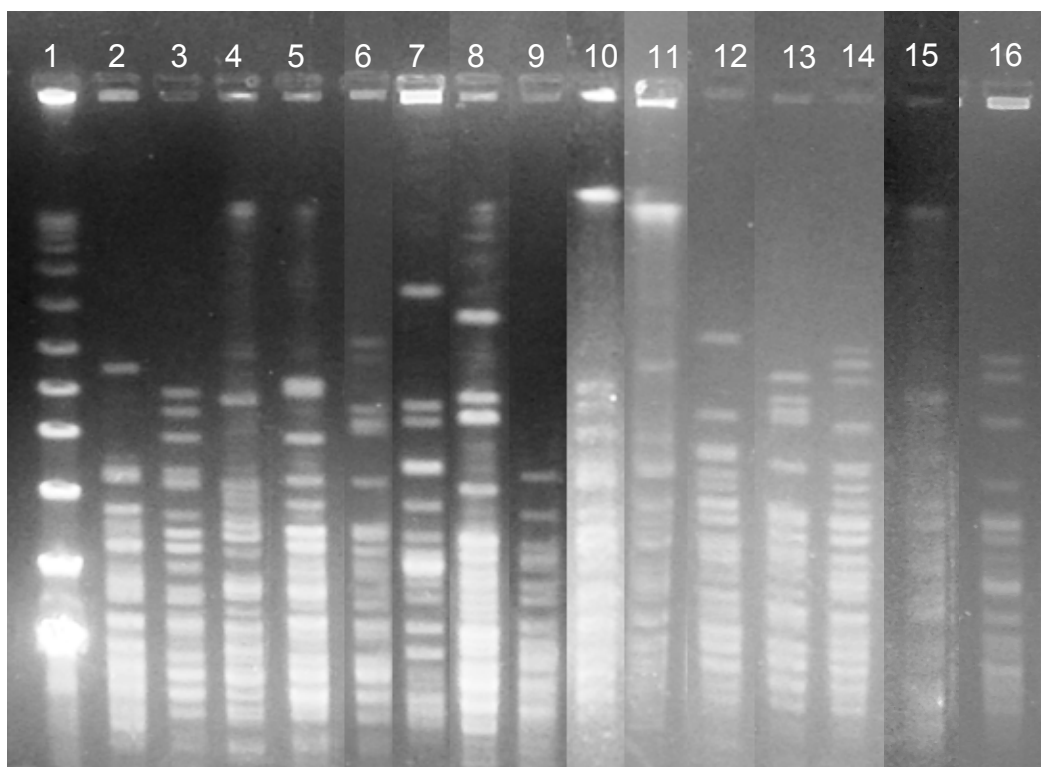


Figura 1 – Perfis obtidos para os isolados de *Acinetobacter* spp. utilizando a técnica de PFGE. Canaletas: 1-marcador molecular DNA Ladder 100; 2- Perfil I; 3- Perfil II; 4- Perfil XI; 5- Perfil X; 6- Perfil IX; 7- Perfil IV; 8- Perfil XIII; 9-Perfil XIV; 10- Perfil XII; 11- Perfil Ia; 12- Perfil V, 13- Perfil III, 14- Perfil VII; 15- Perfil VIII e 16- Perfil VI.

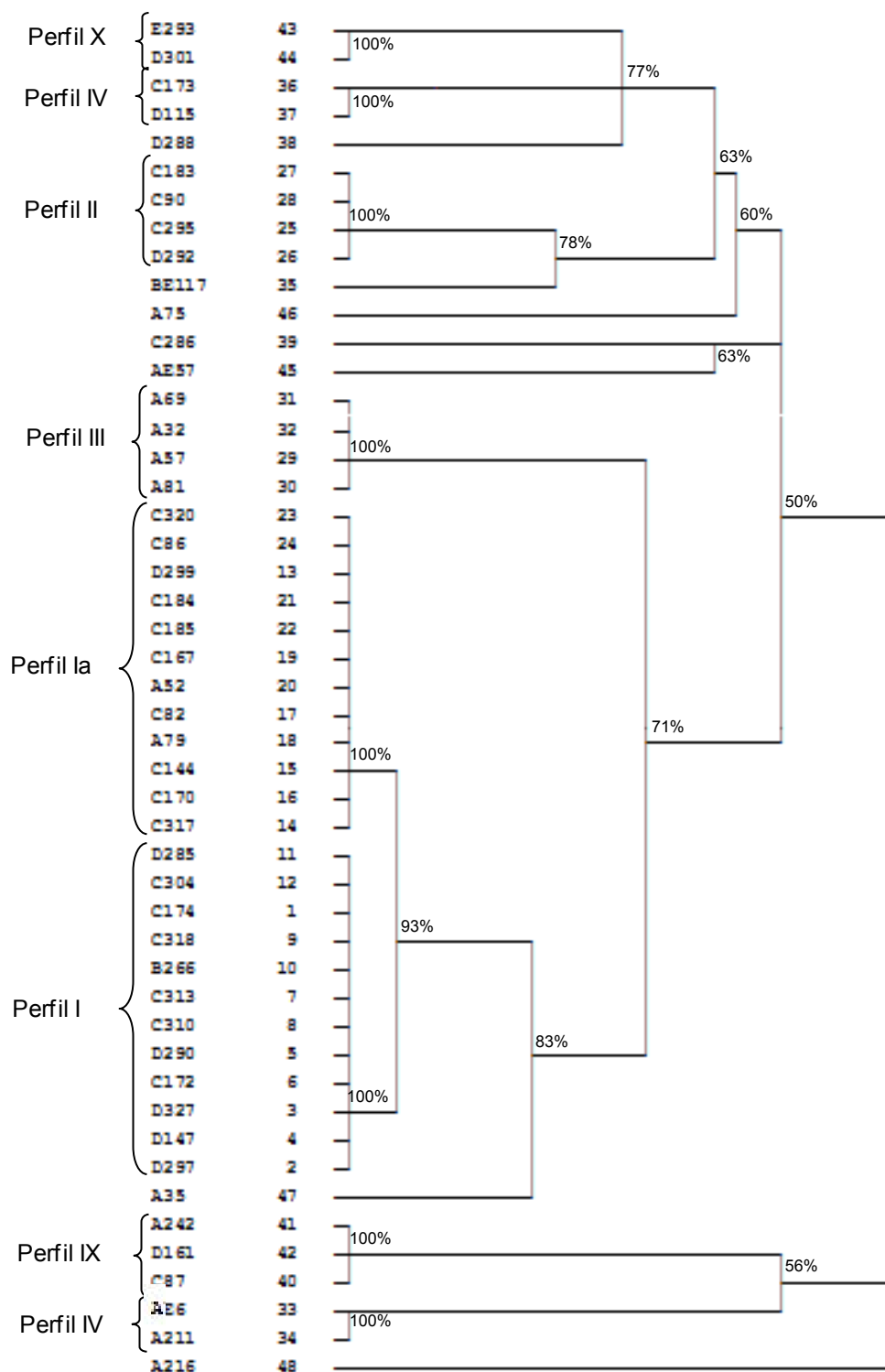


Figura 2 – Dendrograma de P FGE com os isolados de *Acinetobacter* spp. dos diferentes grupos clonais obtidos pela técnica de ERIC-PCR, demonstrando os 15 perfis encontrados. O dendrograma foi obtido através do método de agrupamento usando média aritmética não-ponderada (UPGMA). A similaridade genética indicada no dendrograma foi calculada pelo coeficiente de Dice e o ponto de corte de 80% de similaridade foi utilizado para definição dos grupos clonais. I a XIII representam cada um dos grupos clonais obtidos.

4. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foram utilizados 577 isolados de *Acinetobacter* spp. obtidos de amostras clínicas e de efluente hospitalar. Os 274 isolados clínicos foram coletados em cinco hospitais de grande porte na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil nos anos de 2006 e 2007. Apenas o primeiro isolado de cada paciente foi utilizado. Os 303 isolados de efluente hospitalar, foram coletados nos mesmos períodos das amostras clínicas em três dos cinco hospitais estudados (Tabela 3). Os hospitais foram identificados com letras de A a E, assim como os isolados correspondentes a cada hospital.

A identificação fenotípica e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados clínicos foi obtido junto ao laboratório de microbiologia de cada hospital. Para realização da análise dos perfis e comparação entre hospitais, foram selecionados apenas os antimicrobianos testados nos cinco hospitais: amicacina, ampicilina-sulbactam, cefepime, ceftazidima, imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam. Para os isolados de efluente hospitalar o antibiograma foi realizado utilizando a técnica de disco difusão para 10 antimicrobianos: amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, cefepime, ceftazidima, imipenem, meropenem, aztreonam, ticarcilina-ácido-clavulânico e piperacilina-tazobactam.

Tabela 3 – Distribuição dos isolados de *Acinetobacter* spp. utilizados neste trabalho quanto ao período de coleta, origem e número de isolados analisados em cada hospital.

HOSPITAL	COLETAS DE ISOLADOS CLÍNICOS	COLETAS ISOLADOS DE EFLUENTE	Nº DE ISOLADOS CLÍNICOS	Nº DE ISOLADOS EFLUENTE
A	Fevereiro a Abril/2007 Julho a Outubro/2007	março/2007 agosto/2007	100	101
B	Julho/2006 Julho a Outubro/2007	julho/2006 agosto/2007	32	105
C	Outubro a Dezembro/2006 Maio a Agosto/2007	novembro/2006 julho/2007	93	97
D	Outubro a Dezembro/2006 Maio a Agosto/2007	NC	45	NC
E	Outubro a Dezembro/2006 Maio a Agosto/2007	NC	4	NC

NC- amostras não coletadas.

Entre os isolados clínicos 61% foram resistentes a todos os antimicrobianos testados e 69%, resistente aos carbapenêmicos. Os hospitais com maior porcentagem de resistência aos carbapenêmicos foram o hospital C com 87% e hospital D com 85%. Os hospitais A e B apresentaram porcentagens mais baixas, com 50% e 41%, respectivamente. Os quatro isolados analisados do hospital E apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados.

Entre os isolados de efluente hospitalar apenas três apresentaram perda da suscetibilidade a todos os antimicrobianos testados, sendo dois do hospital A e um do hospital B. Foram encontrados 43% de isolados sensíveis a todos os antimicrobianos testados, sendo o hospital B o de maior porcentagem (67%). O hospital A apresentou 43% dos isolados sensíveis e o hospital C, a menor porcentagem, 22% dos isolados.

O hospital A apresentou 39% de isolados de efluente multirresistentes, o hospital C 41% e o hospital B apresentou menor porcentagem de isolados

multirresistentes, 12%. Resultado semelhante ao encontrado para os isolados clínicos, onde o hospital C também apresentou maior número de isolados multirresistentes (85%), e o hospital B manteve a menor porcentagem de 40%.

A resistência aos carbapenêmicos nos isolados do efluente foi bastante reduzida, 95% dos isolados foram sensíveis a imipenem e 85% a meropenem. Os isolados de efluente hospitalar apresentaram maiores porcentagens de resistência aos antimicrobianos amicacina (39%), ceftazidima (40%) e ciprofloxacina (42%). Entre os isolados clínicos, os antimicrobianos com maior porcentagem de resistência foram cefepime e piperacilina-tazobactam com 88% e 83%, respectivamente.

Analisando os perfis de resistência a antimicrobianos formados pelos isolados de efluente, com 10 antimicrobianos diferentes, pode-se verificar mais de 85 perfis diferentes, demonstrando a diversidade dos isolados encontrados nestes ambientes. Entre os isolados clínicos analisados, utilizando sete antimicrobianos, pode-se identificar 18 perfis, isto se deve principalmente ao fato da maioria dos isolados ter apresentado resistência a todos os antimicrobianos testados.

Os testes fenotípicos de aproximação de disco realizados para detecção das enzimas metalo- β -lactamases, foram realizados para todos os isolados utilizados neste trabalho. Entre os isolados clínicos, 28% apresentaram resultado positivo, uma porcentagem menor foi encontrada entre os isolados de efluente (17%), porém não foram detectados genes para as enzimas metalo- β -lactamases nestes isolados. Estudos posteriores ao que descreveram estes testes avaliaram a eficácia destes métodos e demonstraram a sua baixa especificidade para gênero *Acinetobacter* (Sader *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2004).

Foram realizadas amplificações para a detecção dos genes das metalo- β -lactamases do tipo IMP e VIM em todos os isolados que apresentaram resistência

aos carbapênemicos e/ou resultado positivo nos testes de triagem fenotípica para metalo- β -lactamases, as mais freqüentes em *Acinetobacter* spp. (Maltezou, 2008). No Brasil, até o momento, apenas isolados com a enzima IMP foram identificados (Gales *et al.*, 2003; Fritsche *et al.*, 2005; Sader *et al.*, 2005; Tognim *et al.*, 2006). Também foram testados para a enzima SPM, ainda não encontrada no gênero *Acinetobacter*, mas no Brasil, amplamente disseminada em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (Gales *et al.*, 2003). Todos os isolados foram negativos para presença destes genes.

Estes mesmos isolados foram testados para a oxacilinase OXA-23. Entre os isolados clínicos, foram identificados 61,2% de isolados positivos para este gene, entre as amostras de efluente, três isolados apresentaram resultado positivo. As enzimas carbapenemases do tipo OXA são mais freqüentes em isolados de *Acinetobacter* spp. que as enzimas do tipo metalo- β -lactamases (Stoeva *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2009). Dentro do grupo de enzimas OXA, a OXA-23 tem sido identificada em isolados de *Acinetobacter baumannii* no Brasil (Carvalho *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009).

A maioria das carbapenemases do tipo OXA têm sido descobertas em isolados clínicos de *A. baumannii* em todo o mundo. A primeira β -lactamase do tipo OXA com atividade de carbapenemase foi descrita por Paton *et al.* (1993). Atividade em carbapênemicos é uma propriedade intrínseca de algumas oxacilinas que possuem a capacidade de hidrolizar imipenem (Poirel e Nordmann, 2006). Em nosso estudo, dos 241 isolados testados para a presença do gene *bla*_{OXA-23}, 131 (61%) apresentaram resistência aos carbapênemicos.

Os 577 isolados de *Acinetobacter* spp. deste estudo foram testados para a presença do gene *bla*_{OXA-51}. Este gene tem sido descrito em vários estudos como

intrínseco da espécie *A. baumannii*. Localizado no cromossomo bacteriano ele pode apresentar atividade sobre carbapenêmicos quando o elemento de inserção ISAba1 está localizado acima do gene da enzima. Porém, recentemente o gene da carbapenemase *bla*_{OXA-51} foi encontrada em um isolado clínico da espécie genômica *Acinetobacter 13 TU*. O gene *bla*_{OXA-51} e o elemento de inserção ISAba1, localizado acima do gene da enzima, foram identificados em um plasmídeo, seu seqüenciamento sugere que sua origem é do gene *bla*_{OXA-51} cromossomal encontrado na espécie *A. baumannii*, indicando sua transferência para outra espécie (Lee *et al.*, 2009).

Entre os isolados clínicos, 84% apresentaram o gene da *bla*_{OXA-51}, nos isolados de efluente hospitalar 56% apresentaram o gene. Os isolados de efluente com a enzima OXA-51 apresentaram as maiores taxas de resistência a antimicrobianos. Como indicado em trabalhos anteriores a espécie *A. baumannii* é mais relacionada a Infecções Associadas à Assistência à Saúde (IAAS) que outras espécies e também apresenta maiores taxas de resistência a antimicrobianos (Martins *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010).

Detectamos oito isolados sensíveis aos carbapenêmicos e que apresentaram os genes *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-23}. As enzimas do tipo OXA exibem uma fraca hidrólise de carbapenêmicos e podem não apresentar sempre o perfil de resistência, porém quando estão associadas a elementos de inserção tem um aumento na sua expressão e apresentam resistência aos carbapenêmicos (Higgins *et al.*, 2010).

A presença das enzimas OXA-23 e OXA-51 com atividade de carbapenemase podem estar associadas a alta taxa de resistência a carbapenêmicos encontrada neste estudo com relação aos isolados clínicos e nos três isolados de efluente hospitalar que apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados.

Os isolados de efluente apresentaram uma porcentagem inferior de resistência aos carbapênemicos, mas a maioria dos isolados com perda da suscetibilidade apresentaram o gene *bla*_{OXA-51}. No hospital C, 14 isolados identificados como *A. junii* apresentaram a resistência aos carbapenêmicos, mas não apresentaram nenhum dos genes pesquisados, indicando que outro mecanismo de resistência deve estar presente.

Uma importante característica do gene *bla*_{OXA-23}, e após o trabalho de Lee *et al.* (2009) também da *bla*_{OXA-51}, é a sua capacidade de transferência horizontal entre microrganismos. A transferência horizontal de genes fornece o mais importante mecanismo para acelerar a dispersão de genes de resistência a antimicrobianos (Hawkey, P & Jones, M., 2009). Esta capacidade aliada às características do gênero *Acinetobacter* spp. de permanência no ambiente por longos períodos e a pressão seletiva encontrada no ambiente hospitalar podem ser responsáveis pelos surtos de cepas multirresistentes que vêm ocorrendo em várias partes do mundo.

Utilizando a técnica de ERIC-PCR para analisar os isolados resistentes, foram encontrados 38 grupos distintos, com similaridade >80%, e 19 isolados com perfil único. A maioria dos grupos formados, foram constituídos de dois e três isolados e os grupos maiores foram três grupos com sete isolados (32, 42 e 48) e dois grupos com seis isolados (5 e 6), nestes grupos pode-se observar isolados de diferentes hospitais e diferentes datas de coleta. Estes dados mostram a permanência de isolados endêmicos de *Acinetobacter* spp. nos hospitais, assim como a disseminação destes isolados entre os diferentes hospitais da cidade.

Dos três isolados do efluente hospitalar multirresistentes e portadores do gene *bla*_{OXA-23}, dois pertencentes ao hospital C (CE6 e CE1), apresentaram perfil de

bandas idêntico e 81% de similaridade com os isolados clínicos C149 e D 186, indicando a disseminação de amostras clínicas através do efluente hospitalar.

Foram selecionados aleatoriamente, para análise utilizando a técnica de PFGE, 48 isolados com base nos perfis formados de ERIC-PCR um isolado de cada um dos principais perfis encontrados, sendo 45 clínicos e 3 de efluente hospitalar.

Foram encontrados 14 grupos, sendo um subgrupo Ia com apenas uma banda de diferença do grupo I. Os grupos I e Ia, segundo critérios de Tenover *et al.* (1995), são considerados clones e agrupam 48% dos isolados analisados. Nestes grupos encontram-se isolados de quatro dos cinco hospitais analisados, sendo que do quinto hospital (E) apenas um isolado foi analisado.

Outros estudos no Brasil e em várias partes do mundo têm demonstrado que infecções causadas pelo gênero *Acinetobacter* caracterizam-se pela dispersão de clones dentro de um hospital e entre hospitais (Martins *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2009; Stoeva *et al.*, 2009).

Os dois isolados do efluente hospitalar multirresistentes e que apresentaram o gene *bla_{OXA-23}* (CE6, CE17) apresentaram perfil idêntico e 81% de similaridade com os isolados clínicos C149 e D186, também na análise PFGE. O isolado BE117, também de efluente hospitalar, apresentou perfil único, não se agrupando com outros isolados, mas apresentou três bandas diferentes do perfil X, formado por dois isolados clínicos (E293 e D 301) e cinco bandas diferentes do perfil I, clone predominante nas amostras clínicas deste estudo. Utilizando os critérios de Tenover *et al.* (1995) podemos inferir que este isolado de efluente hospitalar é possivelmente relacionado aos isolados clínicos analisados. Estes dados demonstram uma possível origem clínica dos isolados encontrados no efluente hospitalar.

O hospital é considerado um ambiente fortemente seletivo sobre os microrganismos, contribuindo para o aumento da frequência de bactérias resistentes a antimicrobianos (Goñi-Urriza et al., 2000). Porém o meio ambiente também exerce uma pressão seletiva sobre os microrganismos, um exemplo são os patógenos oportunistas *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacea*, com resistência intrínseca a vários antimicrobianos (Alonso et al., 2001). Outro fator a ser considerado é o impacto causado pelo efluente não tratado, que apresenta grande quantidade de desinfetantes, metais pesados e antimicrobianos e também criam um ambiente seletivo (Baquero et al., 2008).

Segundo Queenan e Bush (2007) é provável que a circulação de genes de resistência ocorra em duas direções: fontes ambientais fornecendo material genético como fonte de enzimas de resistência e as cepas clínicas através da dispersão desta informação tanto no ambiente hospitalar como para o meio ambiente. O efluente hospitalar contribui diretamente para esta dispersão.

A aquisição e dispersão de determinantes de resistência a antimicrobianos entre populações de bactérias virulentas é um problema de grande relevância (Alonso et al., 2001). Com os dados obtidos neste estudo constatamos a presença de isolados de *Acinetobacter* spp. multirresistentes carreadores de genes de resistência no efluente de dois hospitais e similaridade genética com isolados clínicos. Estes efluentes podem estar atuando na seleção e dispersão destes microrganismos, assim como de genes de resistência a antimicrobianos para o meio ambiente.

5. CONCLUSÕES

- Isolados de *Acinetobacter* spp. de amostras clínicas apresentaram maiores taxas de resistência a antimicrobianos, quando comparados aos isolados de amostras de efluente hospitalar, todavia foram encontrados altas porcentagens (30%) de isolados do efluente hospitalar multirresistentes, superiores as encontradas em trabalhos semelhantes.
- Não foi identificado nenhum isolado clínico ou de efluente hospitalar de *Acinetobacter* spp. com os genes das metalo- β -lactamases testadas, os testes fenotípicos para detecção de metalo- β -lactamases não apresentaram bons resultados para isolados do gênero *Acinetobacter*, considerando que vários isolados apresentaram resultados positivos nestes testes e não apresentaram o gene destas enzimas.
- Foi encontrada baixa porcentagem (15%) de isolados de efluente hospitalar com resistência a carbapenêmicos, porém três isolados de *Acinetobacter* spp. foram resistentes a todos os antimicrobianos testados apresentavam os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}.

- Foram encontradas altas porcentagens (84%) de isolados clínicos com o gene *bla*_{OXA-51}, assim como para o gene *bla*_{OXA-23} (61,2%), provavelmente atuando como os principais responsáveis pela alta taxa de resistência a carbapenêmicos encontradas neste estudo.
- A análise de clonalidade entre os isolados clínicos e de efluente hospitalar realizada com os isolados de *Acinetobacter* spp. utilizando as técnicas de PFGE e ERIC-PCR demonstrou relação clonal entre isolados de efluente hospitalar e clínicos, indicando que o efluente dos hospitais contribui para a disseminação de isolados multirresistentes e carreadoras de genes de resistência para o meio ambiente.
- Um clone epidêmico foi identificado em quatro hospitais avaliados, indicando a disseminação destes isolados dentro de um mesmo hospital e entre diferentes hospitais.
- Foram identificados clones de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. coletados em anos diferentes, este resultado mostra a capacidade destes isolados permanecerem no ambiente hospitalar e causar surtos epidêmicos, característicos deste gênero.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBO, A. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis.** v.11, p.22-29, 2005.

ALONSO, A., SANCHEZ, P. and MARTINEZ, J.L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology.** v.3, p.1-9, 2001.

BAQUERO F., J.L. MARTÍNEZ, AND R. CANTÓN. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Curr. Opin. Biotechnol.** v.19, p.260-265, 2008.

BAUMANN, P. Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. **Journal of bacteriology.** v.96, p. 39-42, 1968.

BEBRONE, C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic, organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. **Biochemical pharmacology.** v.74, p.1686-16701, 1007.

BERGOGNE-BEREZIN, E. AND K.J. TOWNER. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clin. Microbiol. Rev.** v.9, p.148-165, 1996.

BIFULCO, J.; SHIREY, J. E BISSONNETTE, G. Detection of *Acinetobacter* spp. In rural drinking water supplies. **Appl. Environ. Microbiol.** v.55, p. 2214-2219, 1989.

BOUVET, P. e G RIMONT, P. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. **Ann. Ins. Pasteur-Microbiol.** v. 138, p. 569-578, 1987.

BUSH, K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin Infect Dis.** v.32, p.1085-1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. e MEDEIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy.** v.39, p. 1211–1233, 1995.

CARVALHO, K. R., A. P. D. A. C. ASSEF, G. PEIRANO et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected

from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Intern. J. Antimicrob. Agents** v.34, p.25-28, 2009.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a β -Lactamase Gene, bla_{GIM-1}, encoding a New Subclass of Metallo- β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother.** v.48, p. 4654-4661, 2004.

CHANG, H. et al. 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, p. 1632-1639, 2005.

CHU, Y. et al IMP-4 a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp collected in Hong Kong between 1994 and 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.45, p. 710-714, 2001.

DA SILVA, G. J. et al. Molecular characterization of blaIMP-5, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. **FEMS Microbiology Letters** . v. 215, p. 33-39, 2002.

DALLA-COSTA, L.M., J.M. COELHO, A.P.H.M. SOUZA, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology.** v.41, p.3403-3406, 2003.

DENTON, M., WILCOX, M.H., PARNELL, P. et al. Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of *Acinetobacter baumannii* on a neurosurgical intensive care unit. **Intensive Crit Care Nurs.** v.21, p.94-8, 2005.

DONALD, H.M., SCAIFE, W., AMYES, S.G., et al. Sequence analysis of AR1-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. **Antimicrobial Agents Chemother.** v.44, p.196-199, 2000.

DONLAN, R. E COSTERTON, W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews.** v.15, p.167-193. 2002.

DURMAZ, R., OTLU, B., HOSOGLU, S., et al. The optimization of rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Jpn J. Infect. Dis.** v.62, p.372-377, 2009.

FRITSCHÉ, T. R. et al. Emerging Metallo- β -Lactamase-Mediated Resistances: A Summary Report from the Worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Clinical Infectious Diseases.** v.41 suplemento, p.276-278, 2005.

FUENTEFRIA, D.B., FERREIRA, A.E., CORÇÃO, G. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.41, p.470-473, 2008.

GALES, A.C., M.C.B. TOGNIM, A.O. REIS, et al. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagnost. Microbiol. Infec. Dis.** v.45, p.77-79, 2003.

GALES, A.C., PFALLER, M.A., SADER, H.S., et al. Genotypic characterization of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter* spp. Isolated in Latin America. **Microbial Drug Resistance.** v.10, p.286-291, 2004.

GOÑI-URRIZA, M., CAPDEPUY, M., ARPIN, C., et al. Impacto na urban effluent on antibiotic resistance of riveverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. **Environ Microbiol.** v.66, p.125-132, 2000.

GUPTA V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Expert Opin Investig Drugs.** v.17, p.131-143. 2008.

HALL, B. G.; SALIPANTE, S. J. e BARLOW, M. Independent Origins of Subgroup BI+B2 and Subgroup B3 Metallo-b-Lactamases. **J Mol Evol.** v.59, p.133–141, 2004.

HANLON, G. The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. **Letters in Applied Microbiology.** v.41, p. 375-378, 2005.

HENWOOD, C. et al. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* in the UK, and in vitro evaluation of tigecycline (GAR-936). **J Antimicrob Chemother.** v.49, p.479-487, 2002.

HERITIER, C., POIREL, L., FOURNIER, P.-E., et al. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents Chemother.** v.49, p.4174-4179, 2005.

HEUER H., KROGERECKLENFORT E., WELLINGTON E. M., et al. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. **FEMS Microbiology Ecology.** v.42, p.289-302, 2002.

HIGGINS, P.G., DAMMHAYN, C., HACKEL, M., et al. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v.65, p.233-238, 2010.

HOUANG, E. T. S. et al. Epidemiology of Rifampin ADP-Ribosyltransferase (*arr-2*) and Metallo- β -Lactamase (*bla*IMP-4) Gene Cassettes in Class 1 I ntegrons in *Acinetobacter* Strains Isolated from Blood Cultures in 1997 to 2000. **Antimicrobial agents and chemotherapy.** v.47, p. 1382–1390, 2003.

HULTON C.S.J., HIGGINS C.F., SHARP P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enteric bacteria. **Molecular Microbiology.** v.5, p.825-834, 1991.

IBRAHIM, A.; GERNER-SMIDT, P. E LIESACK, W. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. **Int J Syst Bacteriol.** v.47, p.837-841, 1997.

JANSSEN, P. et al. Discrimination of *Acinetobacter* Genomic Species by AFLP Fingerprinting. **International journal of systematic bacteriology.** v.47, p. 1179–1187, 1997.

JAWAD, A. et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates. **Journal Of Clinical Microbiology.** v.36, p. 1938–1941, 1998.

JEONG, S.H., BAE, I.K., PARK, K.O., et al. Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. **The Journal of Microbiology.** v.44, p.423-431, 2006.

KARLOWSKY, J. et al. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998-2001. **Antimicrob Agents Chemother.** v.47, p. 1681-1688, 2003.

KOELEMAN, J. et al. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology.** v.36, p.2522-2529, 1998.

KUMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v.54, p.311-320, 2004.

LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 43, p. 1584-1590, 1999.

LEE *et al.* Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clin Microbiol Infect.** v.14, p.49-54, 2008.

LEE, K. et al. Evaluation of Etest MBL for detection of bla_{IMP}-1 and bla_{VIM}-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 43, p. 942-944, 2005.

LEE, K., Y.S. LIM, D. YONG, et al. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **J. Clin. Microbiol.** v.41 p.4623–4629, 2003.

LINTON, K.B., M.B. RICHMOND, R. BEVAN, et al. Antibiotic resistance and R factors in coliform bacilli isolated from hospital and domestic sewage. **J. Medical Microbiol.** v.7, p.91-103, 1974.

MALTEZOU H.C. Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? **Int J Antimicrob Agents**. v. 33, p. 405-407, 2009.

MARAGAKIS, L. and PERL, T.M. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Antimicrobial Resistance**. v.46, p.1254-1263, 2008.

MARTINS, A.F., KUCHENBECKER, R., SUKIENNIK, T., et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection* v.37, p.474-476, 2009.

MENDES R.E, BELL, J.M., TURNIDGE, J.D., et al. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: **report from the SENTRY Surveillance Program** . v.63 p.55-59, 2009.

MENDES, R.E., SPANU, T., DESHPANDE, L., et al. Clonal dissemination of two cluster of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 or OXA-58 in Rome Italy. **Clinical Microbiology and Infection**. v.15, p.588-592, 2009.

MERKIER, A.K., AND D. CENTRÓN. bla (OXA-51)-type beta-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. **Int. J. Antimicrob. Agents**. v.28, p.110-113, 2006.

MISBAH, S., H. HASSAN, M.Y. YUSOF, et al. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. **Singapore Med. J.** v.46, p.461-464, 2005.

MUNOZ-PRICE, L.S. and WEINSTEIN, R.A. *Acinetobacter* infection. **The New England Journal of Medicine**. v.358, p.1271-1281, 2008.

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

NEWBURY S.F., SMITH N.H., ROBINSON E.C., et al. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REO sequences. **Cell**. v.48, p.297-310, 1987.

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

PATON, R., MILES, R.S. HOOD, J., et al. AR1 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinwtobacter baumannii*. **Int. J. Antimicrob. Agents**. v.2, p.81-87, 1993.

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

POIREL L., FIGUEIREDO S., CATTOIR V., et al. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents Chemother.** v.52, p.1252-1256, 2008.

PRADO T., PEREIRA W. C., SILVA D. M. et al. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge os a hospital sewage treatment plant. **Letters in Applied Microbiology.** v.46, 0.136-141, 2008.

PRASHANTH, K., BADRINATH, S.. Epidemiological investigation of nasocomial *Acinetobacter* infections using arbitrarily primed PCR & pulse field gel electrophoresis. **Indian Journal Med. Res.** v.122, p.408-418, 2005.

QUEENAN, A.M., BUSH, K.. Carbapenemases: Versatili β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews.** v.20, p.440-458, 2007.

QUINTEIRA, S. and LUISA-PEIXE, H.F. First isolation of blavim-2 an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.49, p.2140-2141, 2005.

RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 41, p. 223-232, 1997.

SADER et al., Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, p.57-61, 2005.

SCHWARTZ T., KOHNEN t., JANSEN B., et al. Detections of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiology Ecology.** v.43, p.325-335, 2003.

SEIFERT, H. e GERNER-SMIDT, P. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates.**Journal of Clinical Microbiology.** v.33, p.1402-1407, 1995.

SHIBATA, N. et al. PCR Typing of Genetic Determinants for Metallo-b-Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron. **Journal Of Clinical Microbiology.** v.41, p. 5407–5413, 2003.

SHYAMALA V., SCHNEIDER E., AMES G.F.L. Tandem chromosomal duplications:role of REP sequences in the recombination event at the joint-point. **The EMBO Journal.** v.9, p.939-946, 1990.

SINGH, A., GOERING, R.V., SIMJEE, S., et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews.** v.19, p.512-530, 2006.

SINHA, M. e S RINIVASA, 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.

SEKIGUCHI J., MORITA K., KITAO T., et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother.** v.52, p.4194-4197, 2008.

TENOVER, F.C., ARBEIT, R.D., GOERING, R.V., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal Clinical Microbiology.** v.33, p.2233-2239, 1995.

TOGNIM, M.C.B., A.C. GALES, A.P. PENTEADO, et al. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infect Control and Hosp Epidemiol.** v.27 p.742-747, 2006.

TOMARAS *et al.* Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology.** v.149, p.3473-3484. 2003.

TURTON, J. et al. A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in southeast England. **J. Hosp Infect.** v.58, p.170-179, 2004.

TURTON, J.F., N. WOODFORD, J. GLOVER, et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. **J.Clin Microbiol.** v.44, p. 2974–2976, 2006.

VAHABOGLU H., F. BUDAK, M. KASAP, et al. High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. **J Antimicrob Chemother.** v.58, p.537-542, 2006.

VANEECHOUTTE, M. et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Journal of Clinical Microbiology.** v.33, p.11-15, 1995.

VERSALOVIC J., KOEUTH T., LUPSKI J.P. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacterial and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research.** v.19. p.6823-6831, 1991.

VILA, J., MARTÍ, S. and SANCHEZ-CÉSPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v.10, p.1-6, 2007.

WALSH, T. R. et al. Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo-beta-lactamases in Routine Clinical Testing. **Journal Of Clinical Microbiology.** v.40, p. 2755–2759, 2002.

WALTHER-RASMUSSEN, J. and HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal Antimicrobial Chemotherapy.** v.57, p.373-383, 2006.

Yang, C.M., M.F. Lin, P.C. Liao, et al. Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. **Let. Appl. Microbiol.** v.48, p.560-565, 2009.

YONG D. A novel subgroup metallo-beta-lactamase, NDM-1 emerges in *Klebsella pneumoniae* from India. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy – ICAAC (Abstract C1-105), 2009.

YUM, J. H. et al. Molecular characterization of metallo-b-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter genosmospecies 3* from Korea: identification of two new integrons carrying the blavim-2 gene cassettes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v.49, p. 837-840, 2002.

7. Vita

7.1 Dados Pessoais:

Nome: Alessandra Einsfeld Ferreira

Nascimento: 27/10/1976, Pinheiro Machado, RS – Brasil

Filiação: Deisa Mara Einsfeld

Alexandre de Freitas Ferreira

e-mail: einsfeld@gmail.com

7.2 Formação Acadêmica/Titulação

- 2006-atual Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS - Brasil
- 2003-2005 Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS - Brasil
- 1996-1999 Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS – Brasil

7.3 Atuação Profissional

- 2007-atual Microbiologista do Laboratório de Microbiologia – Banco de Pele
Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre,RS – Brasil
- 2005-2008 Professora da disciplina de Microbiologia aplicada do Curso Técnico
em Meio Ambiente, Escola técnica da ACM – Associação Cristã de
Moços, Porto Alegre, RS - Brasil
- 2000 Bolsista de Aperfeiçoamento do CNPQ – Projeto “Desenvolvimento de
desinfetantes alternativos para o tratamento de água: hipoclorito versus
ferrato.” Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH), Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, RS – Brasil.
- 1998-1999 Bolsista de Iniciação Científica da FAPERGS no Projeto
“Comportamento Hidrodinâmico da Lagoa Itapeva e seu efeito potencial
sobre comunidades plantônicas.” Instituto de Pesquisas Hidráulicas
(IPH), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS – Brasil.