

VANESSA CRISTINE KOBS

***Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*: PAPEL DOS
ELEMENTOS GENÉTICOS *bla*_{OXA} e IS*Aba1* NA RESISTÊNCIA AOS
ANTIBIÓTICOS CARBAPENÊMICOS NO AMBIENTE HOSPITALAR**

JOINVILLE

2016

VANESSA CRISTINE KOBS

***Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*: PAPEL DOS
ELEMENTOS GENÉTICOS *bla*_{OXA} e IS*Aba1* NA RESISTÊNCIA AOS
ANTIBIÓTICOS CARBAPENÊMICOS NO AMBIENTE HOSPITALAR**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França

JOINVILLE

2016

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Kobs, Vanessa Cristine

K75a Acinetobacter calcoaceticus – Acinetobacter baumannii: papel dos elementos genéticos *bla_{OXA}* e *ISAba1* na resistência aos antibióticos carbapenêmicos no ambiente hospitalar/ Vanessa Cristine Kobs; orientadora Dr. Paulo Henrique Condeixa França – Joinville: UNIVILLE, 2016.

75 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente
– Universidade da Região de Joinville)

1. Acinetobacter. 2. Acinetobacter baumannii. 2. Carbapenêmicos. 3. Doentes hospitalizados. I. França, Paulo Henrique Condeixa. (orient.). II. Título.

CDD 615.329

Termo de Aprovação

"*Acinetobacter Calcoaceticus - Acinetobacter Baumanni*: Papel dos Elementos Genéticos *bla*OXA e *ISAbal* na Resistência aos Antibióticos Carbapenêmicos no Ambiente Hospitalar"

por

Vanessa Cristine Kobs

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França

Orientador (UNIVILLE)



Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

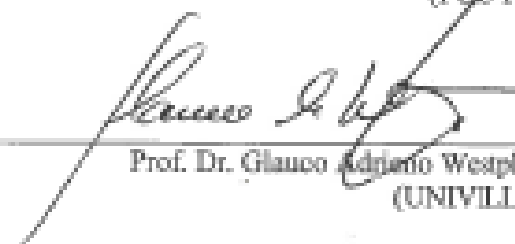
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Marcelo Pilonetto
(PUC-PR)



Prof. Dr. Glauco Adriano Westphal
(UNIVILLE)

Joinville, 03 de fevereiro de 2016

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França, que acreditou em mim e confiou que pudesse desenvolver este projeto. Sempre disponível, paciente e disposto a ajudar. Muito obrigada pela sua extrema dedicação.

À equipe do laboratório de Biologia Molecular em especial Leslie Ecker Ferreira, Jéssica Augustini Ferreira, Thais Brobowicz, Débora Oliveira e Ana Flávia Augustin por todo apoio, dedicação e ajuda.

À professora Roseneide Campos Deglmann pelo grande incentivo, conselhos e orientações durante o trabalho.

Aos meus pais, Inês e Paulo, meu infinito agradecimento. Sempre me incentivaram a nunca desistir dos meus sonhos e acreditaram que um dia chegaria até aqui. Obrigada pelo amor incondicional!

Ao meu noivo João Gabriel Schuelter Nunes, por todos os momentos compartilhados juntos e mesmo com todas as dificuldades, sempre esteve ao meu lado, muito presente, encorajando-me nos momentos em que mais precisei, obrigada do fundo do meu coração!!!

Ao Hospital Dona Helena, que cedeu os isolados clínicos para realização deste trabalho, e ao Sr. Caio Martins Tavares por todo o apoio.

Aos meus queridos amigos que sempre estiveram ao meu lado.

RESUMO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são as mais frequentes complicações ocorridas em pacientes hospitalizados, constituindo grave problema de saúde associado a índices de morbidade e mortalidade relevantes. O gênero bacteriano *Acinetobacter* é reconhecido como importante patógeno causador de IRAS e numerosos surtos causados por representantes multirresistentes do complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* têm sido relatados em diversos países. Nestes microrganismos, as carbapenemases do tipo OXA, enzimas classificadas no grupo D de Ambler, correspondem ao principal mecanismo responsável por resistência aos carbapenêmicos. Adicionalmente, tem sido documentado que taxas mais elevadas de hidrólise dos carbapenêmicos ocorrem devido à aquisição de elementos de inserção próximos aos genes *bla*_{OXA}, especialmente IS*Aba*1. Esse estudo teve como objetivo investigar a ocorrência dos elementos genéticos *bla*_{OXA} e IS*Aba*1 em isolados clínicos identificados entre março de 2009 à março de 2015, pertencentes ao complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*, e a relação com o perfil fenotípico de susceptibilidade aos antibióticos carbapenêmicos no Hospital Dona Helena, em Joinville-SC. Os dados referentes ao perfil fenotípico foram coletados junto ao Serviço de Controle de Infecção Hospitalar da instituição. A investigação conjunta das cinco famílias de genes codificantes de oxacilinases - *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like} e da IS*Aba*1 foi realizada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Todos os isolados (n = 78) analisados apresentaram positividade para o gene *bla*_{OXA-51-like}. Em todos os isolados que amplificaram simultaneamente para os genes *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-23-like} (n = 71; 91,02%) foi observada a presença da IS*Aba*1. Dentre os positivos para IS*Aba*1, verificou-se resistência aos carbapenêmicos em todos os isolados nos quais a IS estava localizada em região adjacente ao gene *bla*_{OXA-23-like} (n = 69; 98,57%). Em um isolado (1,43%) apresentando IS*Aba*1 dissociada do gene *bla*_{OXA-23-like} foi observado sensibilidade à essa classe de antibióticos. Todos os isolados que amplificaram apenas para *bla*_{OXA-51-like} (n = 7; 9%) apresentaram sensibilidade aos carbapenêmicos. Não foram observadas a presença dos genes *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like}. O presente estudo demonstrou que a presença da sequência promotora IS*Aba*1 associada ao gene *bla*_{OXA-23-like} em *A. calcoaceticus* - *A.*

baumannii tem forte relação com a resistência aos antibióticos carbapenêmicos no ambiente hospitalar investigado.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*, carbapenêmicos, IS*Aba*1, *bla*_{OXA-23-like}, oxacilinases.

ABSTRACT

Nosocomial infections are the most frequent complications occurring in hospitalized patients and constitute a serious public health problem associated with significant morbidity and mortality rates. The genus *Acinetobacter* is recognized as an important pathogen causing nosocomial infections and numerous outbreaks caused by multidrug-resistant representatives of the *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* complex have been reported in several countries. In these microorganisms, the OXA-type carbapenemases, enzymes classified in group D of Ambler, correspond to the main mechanism responsible for resistance to carbapenems. Additionally, it has been documented that higher rates of carbapenems hydrolysis are due to the acquisition of insertion elements close of *bla*_{OXA} genes, in particular IS*Aba*1. This study aimed to investigate the occurrence of genetic elements *bla*_{OXA} and IS*Aba*1 identified in clinical isolates from March 2009 to March 2015, belonging to the complex *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*, and the relationship with the phenotypic profile of carbapenems antibiotics susceptibility in Dona Helena hospital in Joinville- SC. The data relating to phenotypic profile were collected by the Hospital Infection Control Service of the hospital center studied. The investigation of five families of genes encoding oxacilinases - *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like} and IS*Aba*1 was conducted using polymerase chain reaction (PCR). All isolates (n=78) analyzed were positive for *bla*_{OXA-51-like} gene. In all isolates that amplified simultaneously for *bla*_{OXA-51-like} genes and *bla*_{OXA-23-like} (n=71, 91,02%) it was observed the presence of IS*Aba*1. Among positive for IS*Aba*1, it was found carbapenem resistance in all isolates in which IS was located adjacent to *bla*_{OXA-23-like} gene (n=69 ; 98.57%). In one isolated (1.43%) presenting IS*Aba*1 dissociated from *bla*_{OXA-23-like} gene was observed sensitivity to this class of antibiotics. All isolates that amplified just for *bla*_{OXA-51-like} (n=7; 9%) were susceptible to carbapenems. The *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} and *bla*_{OXA-143-like} genes were not detected. The present study demonstrated that the presence of the promoter sequence IS*Aba*1 associated with *bla*_{OXA-23-like} gene in *A. calcoaceticus* - *baumannii* is strongly related to resistance to carbapenem antibiotics in the hospital investigated.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, carbapenem, IS*Aba*1, *bla*_{OXA-23-like}, OXA-type carbapenemases.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificantes de oxacilinases.....34

Tabela 2 – Iniciadores utilizados na investigação da sequência IS*Aba*136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC - *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*
- AMPc - Adenosina Monofosfato Cíclico
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
- CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CNS - Conselho Nacional de Saúde
- DNA - *Deoxyribonucleic Acid* / Ácido Desoxirribonucleico
- dNTPs - *Deoxyribonucleotide Triphosphates* / Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
- ESBL - Beta-Lactamase de Espectro Estendido
- HDH - Hospital Dona Helena
- IDSA - *Infectious Diseases Society of America* / Sociedade Americana de Doenças Infecciosas
- IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
- IS - *Insertion Sequence* / Sequência de Inserção
- ISAb₁ - *Insertion Sequence Acinetobacter baumannii 1* / Sequência de Inserção *Acinetobacter baumannii 1*
- MDR - *Multidrug resistant* / Resistência a várias drogas
- MIC - *Minimal Inhibitory Concentration* / Concentração Inibitória Mínima
- MS - Ministério da Saúde
- MβL - Metallo beta-lactamase
- ORF - *Open Reading Frame* / Região Aberta de Leitura
- OXA - Oxacilinase
- pb - Pares de bases
- PBP - Proteínas ligadoras de penicilinas
- PCR - *Polymerase Chain Reaction* / Reação em Cadeia da Polimerase
- SCIH - Serviço de Controle de Infecção Hospitalar
- UNIVILLE - Universidade da Região de Joinville
- UTI - Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)	17
3.1.1 Epidemiologia das IRAS.....	17
3.2 O GÊNERO <i>Acinetobacter</i>	18
3.2.1 O complexo <i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i> (ABC).....	20
3.2.2 Epidemiologia das infecções causadas pelo complexo <i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i>	21
3.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	22
3.3.1 Marcadores moleculares de resistência aos carbapenêmicos	23
3.3.1.1 Produção de Beta-lactamases	23
3.3.1.1.1 Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL)	24
3.3.1.1.2 Metallo-beta-lactamases	24
3.3.1.1.3 Beta-lactamases do tipo AmpC	25
3.3.1.1.4 Oxacilinases	26
3.3.1.2 Sequência de Inserção IS <i>Aba1</i> ("Insertion Sequence <i>Acinetobacter baumannii</i> 1")	27
4 METODOLOGIA	30
4.1 TIPO DE PESQUISA.....	30
4.2 PERÍODO DA PESQUISA E SELEÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS	30
4.3 IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS	30
4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS	31

4.4.1 Métodos fenotípicos	31
4.4.2 Métodos genotípicos	32
4.4.2.1 Obtenção do DNA microbiano	32
4.4.2.2 Avaliação da viabilidade do DNA microbiano.	32
4.4.2.3 Identificação de genes associados à produção de oxacilinases	33
4.4.2.4 Identificação da sequência de inserção IS <i>Aba1</i>	34
4.4.2.5 Eletroforese	35
4.5 ASPECTOS ÉTICOS.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas designadas como Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) atingem frequentemente os sistemas de saúde, constituindo um grave problema de saúde pública mundial, elevando não somente os custos hospitalares, como também os índices de morbidade e mortalidade entre os pacientes acometidos (FREIRE et al., 2013). Cerca de 720.000 pessoas são infectadas em hospitais brasileiros por ano e, destas, 20% evoluem para o óbito. Tais infecções podem ser atribuídas ao ambiente hospitalar e se manifestar durante a internação ou após a alta, acometendo mais de 15% dos pacientes internados, fato agravado com a crescente resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis (BARROS et al., 2012).

O gênero bacteriano *Acinetobacter* é reconhecido como importante patógeno causador de IRAS desde a década de 70 e associa-se com altas taxas de mortalidade no ambiente hospitalar (PAGANO et al., 2012). Apresenta grande capacidade de disseminação e de aquisição de novos mecanismos de resistência antibiótica (CARVALHO et al., 2014). Devido a estas propriedades, numerosos surtos de IRAS causadas por representantes multirresistentes do complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* (ABC) têm sido relatados em diversos países, inclusive no Brasil (CARVALHO et al., 2014; CHEN et al., 2010; PAGANO et al., 2012).

Até o início dos anos 70, as IRAS causadas pelo ABC eram tratadas com sucesso; entretanto, taxas de resistência em elevação começaram a ser divulgadas na primeira metade da década (TOGNIM et al., 2004). O uso crescente de antibióticos carbapenêmicos no ambiente hospitalar é decorrente da elevação da prevalência de bacilos Gram negativos resistentes às cefalosporinas de espectro ampliado (CARVALHO et al., 2014). Por sua vez, o aumento do uso dos carbapenêmicos exerceu uma pressão seletiva sobre a microbiota hospitalar e, desde a década de 90, tem sido documentado um aumento na incidência de isolados resistentes aos carbapenêmicos e a resistência a esta classe de antibióticos tem sido associada principalmente à produção de oxacilinases (OXAs) e às metalo-beta-lactamases (MβLs) (PAGANO et al., 2012).

As carbapenemases do tipo oxacilinases (OXA) são enzimas classificadas no grupo D de Ambler e correspondem ao principal mecanismo responsável pela resistência aos carbapenêmicos no mundo. São enzimas capazes de hidrolisar carbapenêmicos, porém não são ativas contra os antibióticos beta-lactâmicos da família das cefalosporinas de amplo espectro (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Tem sido documentado que taxas mais elevadas de hidrólise dos carbapenêmicos podem ocorrer devido à aquisição de elementos de inserção aos genes *bla*_{OXA} (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}), codificantes de oxacilinases (NOWAK; PALUCHOWSKA; BUDAK, 2012; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; SEGAL et al., 2005; TURTON et al., 2006). Estudos já realizados relacionaram a presença do elemento IS*Aba*1 à frente do gene *bla*_{OXA-51-like} com fenótipos de resistência aos carbapenêmicos. Foi demonstrado que, apesar de intrínseco, a presença deste gene associado a um elemento de inserção pode acarretar em diminuição da suscetibilidade aos carbapenêmicos. A sequência de inserção IS*Aba*1 também foi evidenciada em associação com o gene *bla*_{OXA-23} em isolados resistentes, tendo sido demonstrada uma relação significativa com o aumento das concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos carbapenêmicos imipenem e meropenem (TURTON et al., 2006).

Sendo assim, a grande diversidade de elementos genéticos envolvidos na resistência do ABC aos antimicrobianos vem incentivando a necessidade de estudos a respeito de tais determinantes de resistência (BAHADOR et al., 2015; CARVALHO et al., 2014; KUO et al., 2015; PAGANO et al., 2012). Além disso, o estudo dos determinantes moleculares de resistência aos antimicrobianos, aliado à avaliação da prevalência e disseminação de isolados do ABC, pode ser de grande importância para o melhor entendimento da epidemiologia local das IRAS (CARVALHO et al., 2009).

Mediante o exposto, nota-se a importância epidemiológica do ABC portador de genes codificantes de enzimas do grupo D de Ambler em associação com a sequência de inserção IS*Aba*1, capaz de aumentar a expressão destes genes. Portanto, em vista do aumento da resistência aos carbapenêmicos em bactérias com grande capacidade de causar surtos hospitalares, tais como o ABC, torna-se

relevante a proposição e realização de estudos que investiguem o papel dos elementos genéticos *bla_{OXA}* e *ISAba1*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência dos elementos genéticos *bla*_{OXA} e *ISAb*₁ em isolados clínicos pertencentes ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* e a associação com o perfil fenotípico de susceptibilidade aos antibióticos carbapenêmicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença das famílias de genes codificantes de oxacilinases *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like} em isolados clínicos do ABC.

- Avaliar a associação entre a ocorrência das famílias de genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like} e a resistência fenotípica aos antibióticos carbapenêmicos em isolados do ABC.

- Analisar a evolução temporal e a distribuição setorial dos isolados clínicos do ABC apresentando genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like}.

- Investigar a presença da sequência de inserção *ISAb*₁ em isolados clínicos do ABC.

- Avaliar a associação entre a ocorrência da sequência *ISAb*₁ e a resistência fenotípica aos antibióticos carbapenêmicos em isolados do ABC.

- Analisar a evolução temporal e a distribuição setorial dos isolados clínicos do ABC apresentando a sequência *ISAb*₁.

- Investigar a associação dos genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like} com a ocorrência da sequência *ISAb*₁ em isolados resistentes aos carbapenêmicos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)

As IRAS são as mais frequentes e importantes complicações ocorridas em pacientes hospitalizados (BARROS et al., 2012; MOURA et al., 2007). O Ministério da Saúde (MS), na Portaria nº 2.616 de 12/05/1998, define IRAS como infecções adquiridas após a admissão do paciente na unidade hospitalar e que se manifestam durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; PEREIRA et al., 2005). Pode contribuir para o aumento da morbidade, da letalidade, do tempo de internação, além de constituir ameaça constante à disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos (GARCIA et al., 2013).

Uma infecção caracterizada como IRAS acresce, em média, 5 a 10 dias ao período de internação e, além disso, os gastos relacionados a procedimentos diagnósticos e terapêuticos das IRAS fazem com que o custo seja cerca de três vezes maior que o custo dos pacientes sem infecção (BARROS et al., 2012; WENZEL et al., 1995). Acrescenta-se a isso as repercussões para o paciente, sua família e a comunidade em geral, tal como o afastamento da vida social e do trabalho, com conseqüente comprometimento social, psicológico e econômico (GARCIA et al., 2013).

3.1.1 Epidemiologia das IRAS

No âmbito internacional, estudos apontam que a prevalência de IRAS foi mais alta na América Latina e Ásia (11,4%) do que na Europa (9,3%), nos Estados Unidos da América (EUA) (8,7%) e no Canadá (8,6%). Na Europa, pesquisas diversas revelaram que a prevalência foi de 9,9% em 1990 na Espanha; 6,3% em 1991 na Noruega; 6,3% em 1986 na França; 9% em 1979 na Dinamarca e 15,5% em 1975 na Suécia. Na Inglaterra, Escócia, País de Gales e Irlanda, a pesquisa nacional realizada pelo “Hospital Infection Society” da Grã-Bretanha entre 1993 e 1994 obteve uma taxa de prevalência de IRAS de 9%, sendo maior nos hospitais

universitários (11,2%) que nos demais (8,4%) (FERREIRA; NOLASCO; ESPÍNDOLA, 2010).

O estudo realizado por Dereli e colaboradores (2013), realizado entre os anos de 2007 à 2010 na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Departamento de Anestesiologia de um hospital localizado na Turquia, com o objetivo de analisar as IRAS e os fatores que contribuem para infecções na UTI, revelou que 54,9% das IRAS foram causadas por bacilos gram negativos, tendo sido o ABC o agente mais frequentemente isolado. É reconhecido que a frequência e distribuição dos microrganismos causadores de IRAS variam de acordo com os países, hospitais e clínicas (DERELI et al., 2013).

Um estudo realizado por Dal-bó, Silva & Sacae (2012) em UTI Pediátrica e Neonatal do Hospital Nossa Senhora da Conceição, em Tubarão-SC, demonstrou uma prevalência de IRAS na unidade estudada de 45,8%, acima da variação média de IRAS (18 a 34%) relatada em países em desenvolvimento, como o Brasil.

Lima e colaboradores (2007) relataram que os dados sobre IRAS no Brasil são pouco divulgados, sendo de grande importância que cada instituição defina sua situação epidemiológica em termos do conhecimento da microbiota hospitalar e da frequência de ocorrência de infecções.

Nos últimos anos, a incidência de IRAS associadas a microrganismos resistentes tem aumentado em todo o mundo (GARCIA et al., 2013). Observa-se, também, o aumento na incidência de infecções por *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas spp.* resistentes às cefalosporinas, carbapenêmicos, quinolonas e aminoglicosídeos (MARTINS et al., 2006).

3.2 O GÊNERO *Acinetobacter*

Em 1911, um microbiologista holandês chamado Beijerinck descreveu um microrganismo isolado do solo e denominou-o *Micrococcus calcoaceticus*. Em 1954, a designação "*Acinetobacter*" (akinetos, do grego "não móvel") foi proposta ao microrganismo por Brisou & Prévot, com o objetivo de separar os microrganismos móveis dos não móveis (PAGANO et al., 2012).

Os *Acinetobacter spp.* são microrganismos de vida livre presentes no ambiente (água, solo e alimentos), colonizando a pele de cerca de 0,5% dos

humanos saudáveis e, mais raramente, os tratos respiratório e gastrointestinal (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

O gênero integra a família *Moraxellaceae* e é composto por cocobacilos Gram negativos, imóveis, não fermentadores de glicose, metabolismo oxidativo, aeróbios estritos, catalase positivos e reação de oxidase negativa, com bom crescimento em ágar sangue e ágar MacConkey (BROWN; AMYES; LIVERMORE, 2006). No ágar sangue, formam colônias branco-acinzentadas; no ágar MacConkey formam colônias de coloração levemente rosa (devido à pouca oxidação da lactose) convexas, translúcidas e opacas e em algumas amostras ambientais pode ser observada a produção de pigmento marrom. Possuem de 39 a 47% moles de conteúdo GC (guanina e citosina) em seu DNA (CARVALHO et al., 2014). São decompositores com distribuição cosmopolita que fazem parte da composição normal da generalidade dos solos e exercem um papel importante na decomposição de matérias ricas em compostos aromáticos, integrando um dos níveis tróficos essenciais da microbiologia ambiental (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Em 1986, Bouvet e Grimont, por meio de técnicas de hibridização de DNA bacteriano, estabeleceram a existência de 12 genospecies distintas. Porém, algumas modificações significativas na classificação taxonômica aconteceram nos últimos anos e cerca de 25 genospecies já foram reconhecidas, entretanto, foram atribuídas a designação de espécie às genospecies – 1, 2, 4, 5, 7, 8 e 12 respectivamente denominadas *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. lowffii* e *A. radioresistens*. Além disso, as denominações de *A. pittii* e *A. nosocomialis* foram propostas para as espécies *A. genoespécie 3* e *A. genoespécie 13TU* respectivamente (CARVALHO et al., 2014; DIJKSHOORN et al., 2007; DOLZANI et al., 1995; KAMBLE et al., 2015; NEMEC et al., 2011; SEIFERT et al., 1997).

Devido à dificuldade de separação através de testes convencionais e sistema de hibridização do DNA, por apresentarem similaridades fenotípicas e genotípicas, foi proposto que *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* fossem agrupadas em um conjunto denominado complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (ABC) apesar de serem geneticamente distintas (BOUVET; GRIMONT, 1986).

Entre as 34 espécies descritas de *Acinetobacter*, o ABC é considerado de maior importância clínica, sendo a *A. baumannii* a principal espécie relacionada a surtos de IRAS (PAGANO et al., 2012).

3.2.1 O complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (ABC)

Apesar do ABC não ser considerado de elevada virulência, sua importância é atribuída à dificuldade de controle e à capacidade de causar surtos, que podem durar de 1 a 3 meses (TEIXEIRA et al., 2013). Sugere-se que a patogenicidade desta espécie seja geralmente baixa, sendo a colonização por ABC mais comum que a infecção, porém, o quadro de infecção, quando instalado, pode ser agravado (CARVALHO et al., 2014). Por apresentar grande capacidade de se disseminar e de adquirir novos mecanismos de resistência, numerosos surtos causados pelo ABC multirresistente têm sido relatados em diversos países, inclusive no Brasil (PAGANO et al., 2012).

Sua capacidade de formar biofilmes está diretamente relacionada com o aumento da resistência aos antimicrobianos, pois promove a colonização de superfícies e equipamentos e propicia maior adesão às células epiteliais do trato respiratório, assim como associa-se ao aumento da incidência de infecções relacionadas ao uso de dispositivos invasivos (LEE et al., 2008; RAO et al., 2008). No ambiente hospitalar é geralmente encontrado nos equipamentos de ventilação e tubos de ressuscitação, umidificadores, banhos de diálise, cateteres intravenosos, luvas de procedimentos ou soluções farmacológicas (TEIXEIRA et al., 2013).

Por ser um microrganismo com grande versatilidade nutricional, utilizando uma larga variedade de substratos como fonte de carbono, o ABC possui características únicas que o diferenciam das bactérias Gram negativas usuais, facilitando a persistência e a adaptação ao ambiente hospitalar e sua proliferação em enfermarias e entre pacientes (CARVALHO et al., 2014; HÉRITIER; POIREL; NORDMANN, 2006; PAGANO et al., 2012; TURTON et al., 2006) Encontra-se amplamente distribuído na natureza, podendo ser isolado até mesmo em geleiras (PAGANO et al., 2012).

Os fatores de risco que predispõem a infecções causadas pelo ABC incluem hospitalização por período prolongado, cirurgias, procedimentos invasivos como

cateteres ou ventilação mecânica, falha cardiovascular ou respiratória, permanência em UTIs e terapias antimicrobianas prévias (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Sendo assim, o ABC é um dos patógenos de maior associação às IRAS, incluindo pneumonias, meningites secundárias, infecções urinárias e bacteremias (CARVALHO et al., 2014; PAGANO et al., 2012). Além disso, está associado a altas taxas de mortalidade (CHEN et al., 2010).

A identificação laboratorial de *Acinetobacter* em nível de espécie é complexa devido a grande similaridade entre as espécies do gênero, sendo necessárias técnicas de tipagem molecular para sua diferenciação. O método de hibridização de DNA mantém-se como padrão ouro para a identificação genotípica (HIDRI, 2012). A presença do gene *bla*_{OXA-51-like} é o marcador genético utilizado para identificar a espécie *A. baumannii*, considerado intrínseco e exclusivo (TURTON et al., 2006).

3.2.2 Epidemiologia das infecções causadas pelo complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*

Devido sua notável capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos de amplo espectro, o ABC tem emergido na última década como um dos principais patógenos nosocomiais em todo o mundo. Sua rápida disseminação e propagação clonal entre setores do hospital e, até mesmo, entre hospitais têm sido documentadas em estudos conduzidos em vários países (EL-AGEERY et al., 2012; MENDES et al., 2009; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Em estudo realizado em um hospital público municipal em João Pessoa por Figueiredo, Vianna e Nascimento (2013), observou-se que o ABC foi responsável por 16% das IRAS. Outro estudo, realizado por Oliveira, Kovner e Silva (2010) em um hospital universitário em Minas Gerais revelou que o ABC foi identificado como o microrganismo mais comum (36,3%) dentre os causadores de IRAS. Neste mesmo estudo verificou-se que 39,5% dos pacientes que apresentaram IRAS foram à óbito (OLIVEIRA; KOVNER; SILVA, 2010).

O ABC apresenta resistência à maioria dos antimicrobianos comumente utilizados na clínica médica. Atualmente, a emergência do ABC MDR (Multi-Drug Resistant), incluindo resistência a polimixina B, tem sido evidenciada em vários hospitais na Europa, América do Norte, Brasil, Argentina, China, Taiwan, Hong

Kong, Japão e Coréia do Sul (AL JOHANI et al., 2010). Foi referido entre os seis microrganismos mais isolados e de difícil tratamento devido seu alto nível de resistência segundo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA; *Infectious Diseases Society of America*) (BOUCHER et al., 2009).

Os surtos hospitalares causadas pelo ABC MDR são relatados desde 1980, principalmente na Inglaterra, França, Alemanha, Itália, Espanha e Holanda e também têm sido observados em regiões do Brasil (DALLA COSTA et al., 2003; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Na investigação epidemiológica dos surtos, técnicas de tipagem molecular têm sido empregadas com o intuito de verificar a transmissão clonal entre hospitais por meio da transferência de pacientes colonizados, confirmando-se a disseminação de isolados de ABC MDR entre países do norte da Europa, como Bélgica e Alemanha (BOGAERTS et al., 2006; HIGGINS et al., 2010; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

3.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

São relativamente poucos os antimicrobianos que se mostram ativos contra ABC MDR e por essa razão, as infecção causadas por ele tornaram-se um desafio significativo para os sistemas de saúde (FEITOSA et al., 2012).

As IRAS causadas por esse complexo eram tratadas com sucesso com gentamicina, minociclina, ácido nalidíxico, ampicilina ou carbenicilina, tanto isoladamente quanto combinados, até o início dos anos 70. Porém, taxas de resistência em elevação começaram a ser divulgadas entre 1971 e 1974 (POIREL, et al., 2010). A partir de 1975, os carbapenêmicos tornaram-se opções terapêuticas de primeira escolha em vários centros hospitalares quando tais microrganismos apresentavam resistência aos inibidores da beta-lactamase (LIVERMORE, WOODFORD, 2000; PAGANO et al., 2012).

O modo de ação dos carbapenêmicos consiste na capacidade de ligação às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) presentes na parede bacteriana, provocando a lise osmótica, ao penetrar com facilidade pelos canais porínicos nos microrganismos gram negativos, fazendo a indução de um efeito pós-antibiótico (KATTAN; VELLEGGAS; QUINN, 2008). Os carbapenêmicos são mais resistentes à hidrólise pela maioria das enzimas beta-lactamases, tanto cromossômicas como

plasmidiais, tornando-os opções terapêuticas de escolha preferencial frente a outras classes de antimicrobianos (LIVERMORE; WOODFORD, 2000). Entretanto, desde a década de 90, tem sido documentado um aumento na incidência de isolados resistentes aos carbapenêmicos e, desde então, a resistência ao imipenem tem se elevado em todo o mundo (MARTINEZ; MATAR, 2012; PAGANO et al., 2012).

São vários os mecanismos de resistência antimicrobiana relacionados ao gênero *Acinetobacter sp.*, tais como hidrólise por beta-lactamases, alteração na permeabilidade da membrana externa, redução da afinidade dos antibióticos pelas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) e aumento da atividade de bombas de efluxo, sendo a produção de beta-lactamases da classe B (metalo beta-lactamases) e da classe D de Ambler (OXA-carbapenemases) os mecanismos mais importantes e os da classe D os mais prevalentes (CARVALHO et al., 2011; GOOTZ et al., 2008; HIGGINS et al., 1999; PAGANO et al., 2012).

3.3.1 Marcadores moleculares de resistência aos carbapenêmicos

3.3.1.1 Produção de Beta-lactamases

A produção de enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico, conhecidas como beta-lactamases, consistem o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram negativas aos antibióticos e a classificação destas enzimas ocorre de acordo com sua estrutura molecular (classificação de Ambler) ou em base das diferenças em seus mecanismos catalíticos (LIVERMORE, 1995). Além disso, a quantidade de enzima produzida, a habilidade em hidrolisar o antimicrobiano e a velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa bacteriana é o que determina a capacidade dessas beta-lactamases em conferir resistência (LIVERMORE, 2001).

As beta-lactamases já descritas mais presentes em isolados de *A. baumannii* são beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), metalo beta-lactamases (M β L) AmpC e oxacilinasas (OXA) (CARVALHO et al., 2014).

3.3.1.1.1 Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL)

Pertencentes à classe A de Ambler essa classe de enzima representa o maior grupo de beta-lactamases estudadas (CARVALHO et al., 2014). Apresentam serina no seu sítio ativo e são codificadas por genes localizados em plasmídios. Podem conferir resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos monobactâmicos, como também aos carbapenêmicos, mas em baixos níveis. Geralmente, são inibidas pelos inibidores de beta-lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. (BUSH; JACOBY, 2010; CARVALHO et al., 2014; LIVERMORE, 2008).

Em *Acinetobacter spp.* várias ESBLs já foram descritas, tais como, PER-1, VEB-1, PER-2, VEB-1, SHV-12, CTX-M-2, VEB 1^a, TEM-92, SHV-5, VEB-3, GES e GES-11 (CARVALHO et al., 2014). Uma vez que o mecanismo é mediado por plasmídios, os microrganismos produtores de ESBL possuem grande importância clínica, pois faz com que a transmissão horizontal seja facilitada. A presença de cepas produtoras de ESBL acarreta implicações terapêuticas, pois minimizam as opções de antibióticos, podendo aumentar a prescrição de carbapenêmicos (LAGO et al., 2010).

Em *A. baumannii* a prevalência destas enzimas é pouco conhecida devido à dificuldades na detecção fenotípica laboratorial, pois a presença de outros mecanismos, como a presença de cefalosporinases - especialmente a enzima *AmpC*, podem interferir na detecção de ESBL. (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

3.3.1.1.2 Metallo-beta-lactamases

As enzimas do tipo metallo-beta-lactamases (MβLs) são pertencentes à classe B de Ambler e possuem a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos, bem como todos os outros antibióticos beta-lactâmicos, com a exceção do aztreonam (NORDMANN; POIREL, 2002). Estas enzimas caracterizam-se por apresentarem um íon metálico, geralmente o zinco (Zn^{2+}), no sítio ativo que participa da catálise (QUEENAN; BUSH, 2007). Desde o início da década de 90 a produção de enzimas em isolados de *Acinetobacter spp.* é uma causa importante de redução de

sensibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos (POIREL; NAAS; NORDAMANN, 2010).

As MβLs são codificados por genes presentes em cassetes gênicos localizados no cromossomo ou plasmídeo bacteriano, geralmente localizados em integron de classe 1 (TOLEMAN et al., 2002). Quando esses genes se associam a elementos genéticos que conferem mobilidade ao gene, são facilmente transferidas entre diferentes cepas da mesma espécie e ainda entre espécies distintas sendo conhecidas como MβLs móveis ou adquiridas (SACHA et al., 2008).

No Brasil, foi descrita pela primeira vez uma amostra de *A. baumannii* produtora de MβLs do tipo IMP-1, proveniente de uma cultura de secreção traqueal de um paciente internado na UTI geral do Hospital São Paulo em 2000 (GALES et al., 2003). Desde então, a disseminação de isolados produtores de MβLs tem sido frequentemente descritas em hospitais brasileiros (TOGNIM et al., 2006).

A enzima NDM-1 é uma das mais recentes MβLs adquiridas e sua propensão à disseminação causa grande preocupação (CARVALHO et al., 2011). Esta enzima foi detectada pela primeira vez em 2008, numa cepa de *K. pneumoniae* de um paciente que retornava para a Suécia a partir da Índia e desde então muitos outros países têm relatado este mecanismo de resistência (YOUNG et al., 2009). Em 2010 foi isolado em quase todos os continentes e cerca de 40 países (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; YOUNG et al, 2009). Na América Latina, a enzima NDM-1 foi descrita pela primeira vez em 2011, em *Klebsiella pneumoniae* na Guatemala e Colômbia (ESCOBAR et al., 2013; PASTERAN et al., 2012). No Brasil o primeiro caso de *Acinetobacter baumannii* produtora de NDM-1 foi descrita pela primeira vez em 2013 na cidade de Londrina, Estado do Paraná (PILLONETTO et al., 2014).

3.3.1.1.3 Beta-lactamases do tipo AmpC

As enzimas *AmpC*, são enzimas cromossômicas pertencentes à classe C de Ambler, que conferem resistência às penicilinas, inclusive às associadas à inibidores de beta-lactamases (sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico), cefalosporinas de 1ª, 2ª e 3ª gerações, e aos monobactâmicos (aztreonam) (BUSH; JACOBY, 2010).

A síntese cromossomal desta enzima pode ser induzível em várias enterobactérias resistentes a antibióticos beta-lactâmicos, entretanto, em

Acinetobacter sp a enzima *AmpC* não é induzível e normalmente é expressa em baixos níveis (BOU; MARTÍNEZ-BELTRÁN, 2000). O aumento da expressão do gene *bla_{AmpC}* é regulado pela sequência promotora denominada IS*Aba1* (HÉRITIER; POIREL; NORDMANN, 2006). A hiperexpressão de *AmpC* confere resistência à maioria das cefalosporinas de amplo espectro, entretanto cefepima e carbapenêmicos não são hidrolizados por esta enzima (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

3.3.1.1.4 Oxacilinasas

As oxacilinasas (OXA) são enzimas que pertencem à classe D de Ambler e apresentam o grupamento serina no seu sítio ativo, inativam principalmente os antimicrobianos carbapenêmicos e algumas cefalosporinas, como a cefepima; no entanto, não há ação hidrolítica para a ceftazidima (BROWN; AMYES, 2006; POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010).

As oxacilinasas com atividade carbapenemase são mais comuns em *A. baumannii* e representam um dos principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos nestas bactérias (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Aproximadamente 151 variantes dessas já foram descritas e ao menos 45 apresentam atividade de hidrólise de carbapenêmicos (KUSRADZE et al., 2011). Em *Acinetobacter*, as OXAs são divididas geneticamente em seis subgrupos mais frequentemente identificados, a saber: *bla_{OXA-23-like}* (OXA-23, OXA-27 e OXA-49), *bla_{OXA-24-like}* (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 e OXA-72), *bla_{OXA-58-like}*, *bla_{OXA-143-like}* (OXA-143, OXA-231, OXA-253 e OXA-255), *bla_{OXA-235}* e *bla_{OXA-51-like}*, sendo esta última intrínseca à espécie *A. baumannii* (HIGGINS et al., 2013; OPAZO et al., 2012; ZANDER et al., 2014).

A primeira cepa de *A. baumannii* portadora de serina beta-lactamase capaz de hidrolisar imipenem, foi isolada em 1985, na Escócia e apresentou resistência ao imipenem, às penicilinas e às cefalosporinas e foi denominada OXA-23 (PATON et al, 1993).

Após a primeira publicação, foram descritos outros relatos que identificaram variantes frequentes das enzimas OXA no ABC, como a OXA-24, na Espanha, Bélgica, Portugal, França, EUA; e a OXA-58 no Brasil, França, Espanha, Bélgica,

Turquia, Romênia, Grécia, Itália, Austria, Argentina, Austrália, EUA, Kwait e Paquistão. Entre as enzimas relatadas com menor frequência estão: OXA-25, OXA-66 e OXA-68, na Espanha; OXA-69 e OXA-78, na Turquia; OXA-70, em Hong Kong; OXA-40, OXA-58, OXA-75 e OXA-76, na França; OXA-26, na Bélgica; OXA-27, em Singapura; OXA-49, na China; OXA-64 e OXA-71, na África do Sul; OXA-65, na Argentina e OXA-69; OXA-72, na Tailândia e OXA-143 no Brasil (FIGUEIREDO et al., 2011; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006).

No Brasil o primeiro relato da presença do gene *bla*_{OXA-23-like} foi em 1999 na cidade de Curitiba - PR, sendo identificados oito isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de dois hospitais (DALLA COSTA et al., 2003).

As enzimas pertencentes ao subgrupo OXA-51 são codificadas por genes intrínsecos (cromossomais) à espécie *A. baumannii* e estes podem ser utilizados para a confirmação genotípica da identificação da espécie (FIGUEIREDO; VIANA; NASCIMENTO, 2013; NOWAK; PALUCHOWSKA; BUDAK, 2012). Sabe-se que as OXA carbapenemases codificadas em plasmídeos estão associadas com a resistência crescente aos carbapenêmicos, mas enzimas OXA-51, apesar da sua fraca capacidade de hidrolisar carbapenêmicos, também podem estar envolvidas na redução da sensibilidade (BARIN et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2009; RUIZ et al., 2007; TURTON et al., 2006). A presença de uma sequência de inserção pode prover ao gene *bla*_{OXA-51-like} um promotor forte, fazendo com que sua expressão seja aumentada, potencializando a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos (FIGUEIREDO; VIANA; NASCIMENTO, 2013; TURTON et al., 2006).

3.3.1.2 Sequência de Inserção IS_{Aba1} ("Insertion Sequence *Acinetobacter baumannii* 1")

Definidas como os menores e mais abundantes elementos genéticos capazes de efetuar transposições independentes nos genomas microbianos, as sequências de inserção (IS) podem causar inserções, mutações e rearranjos genômicos (PAGANO et al., 2012). As IS possuem papel importante na disseminação de determinantes de virulência e de resistência, pois fornecem

mobilidade interespécies a esses genes (CARVALHO et al., 2014; MAHILLON; CHANDLER, 1998; PAGANO et al., 2012; LEE et al., 2008).

As IS bacterianas são os tipos mais simplificados de elemento transponível, raramente ultrapassando o tamanho de 2 kb. Consistem de unidades autônomas responsáveis por codificar proteínas que atuam apenas na transposição desses elementos. Cada IS possui diferenças em sua sequência, entretanto possuem algumas estruturas comuns em sua organização (CARVALHO et al., 2014). Toda IS apresenta pequenas Regiões Abertas de Leitura (ORF - Open Reading Frame), que são sequências terminais que definem suas extremidades, além de possuírem uma sequência responsável por codificar uma transposase (MAHILLON; CHANDLER, 1998). Podem se integrar a uma variedade de sítios no genoma, podendo ser encontradas no cromossomo ou em plasmídeos (MUGNIER; POIREL; NORDMANN, 2009). Normalmente estão presentes em múltiplas cópias ao longo do genoma, onde em conjunto podem atuar simultaneamente em vários genes alvo (ANTONIO et al., 2011). Geralmente possuem preferência por determinadas regiões do genoma e seu número de cópias pode variar de uma espécie para outra (PAGANO et al., 2012).

Além disso, algumas IS atuam na ativação ou no aumento da expressão de genes localizados adjacentes a elas (MAHILLON; CHANDLER, 1998; MUGNIER; POIREL; NORDMANN, 2009). Essa ativação de genes vizinhos já foi descrita em diversas famílias de IS como IS1, IS2, IS3, IS4, IS5 e IS10 e esse fenômeno pode ser devido à presença de regiões promotoras no elemento de inserção ou pela formação de novos promotores após a inserção (CARVALHO et al., 2011).

A importância das IS na resistência aos carbapenêmicos no ABC vem sendo descrita (MARTINEZ; MATTAR, 2012). Estudos têm demonstrado que algumas IS, especialmente IS*Aba1*, possuem um papel importante na resistência do ABC (MUGNIER; POIREL; NORDMANN, 2009) O elemento IS*Aba1* pertence à família IS4, possui sequência de 11 pb, está flanqueado por sequências repetidas de 9 pb e é prevalente no ABC (CARVALHO et al., 2011; PAGANO et al., 2012).

A sequência IS*Aba1* tem sido frequentemente encontrada na região à frente de genes como *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{AmpC} (PAGANO et al., 2012). Em estudo realizado por Turton e colaboradores (2006), os autores sugeriram que os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51} conferiram resistência aos carbapenêmicos quando acompanhados do elemento IS*Aba1*. As sequências IS*Aba1*, IS*Aba2* e IS*Aba4*

também foram identificadas e localizadas *upstream* aos genes *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-23} em isolados clínicos do ABC (HÉRITIER; POIREL; NORDMANN, 2006).

Conforme Carvalho e colaboradores (2011), uma vez que já foram identificados genes e IS que potencializam a expressão da resistência antimicrobiana em microrganismos fenotipicamente sensíveis e que tais elementos genéticos podem ser transferidos de uma bactéria para outra, o futuro do controle de infecções nosocomiais e da prevenção de surtos por microrganismos MDR poderá necessitar técnicas moleculares caracterizadores dos patógenos associados às IRAS.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE PESQUISA

Estudo descritivo e analítico para a investigação fenotípica e molecular de isolados clínicos bacterianos pertencentes ao ABC.

4.2 PERÍODO DA PESQUISA E SELEÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

O estudo foi desenvolvido no Hospital Dona Helena (HDH), hospital geral com 189 leitos, e no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), ambos localizados em Joinville – SC. Foram considerados os isolados clínicos identificados durante seis anos, a partir de março de 2009, durante a avaliação microbiológica assistencial como pertencentes ao ABC. Parte dos isolados encontram-se armazenados sob congelamento, enquanto os outros foram obtidos prospectivamente à medida que foram sendo identificados na rotina laboratorial. Não foram incluídos os isolados derivados do mesmo paciente e sítio anatômico durante o mesmo período de internação.

Foram desconsiderados os isolados que, após a avaliação genotípica, não apresentaram positividade para *bla*_{OXA-51-like}, gene intrínseco à espécie *A. baumannii*. As cepas congeladas a partir de março de 2009 que não obtiverem reativação ou que apresentarem sinais de contaminação foram excluídas do estudo.

4.3 IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

As amostras clínicas foram submetidas aos procedimentos rotineiros para a identificação do microrganismo correspondente a cada isolado empregando-se o sistema automatizado “Microscan Walkaway” (Siemens, Munique, Alemanha), conforme instruções do fabricante, paralelamente à realização da bacterioscopia pelo Gram.

Após realizada a identificação, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar MacConkey (Biomérieux, Rio de Janeiro,

Brasil), sob incubação a 37°C, por 24 horas e analisados macro e microscopicamente. Em seguida, os microrganismos passaram a ser armazenados em tubos criogênicos de 2 mL contendo seis miçangas de vidro e meio próprio para congelamento a -80°C, contendo 6% de glicerol, 37 g.L⁻¹ de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e 0,6 g.L⁻¹ de ágar. Antes do congelamento para conservação a longo prazo a -80°C, os isolados foram inicialmente incubados a 37°C durante 48 horas, seguido de resfriamento a -20°C por 24 horas.

4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

4.4.1 Métodos fenotípicos

A determinação do perfil de susceptibilidade aos antibióticos foi realizada empregando-se o método de disco-difusão em ágar (Kirby e Bauer). Quanto aos carbapenêmicos foram utilizados discos de imipenem ou meropenem contendo 10 µg de cada antibiótico. Simultaneamente, foram testadas outras classes de antimicrobianos nas seguintes quantidades indicadas pelo CLSI de cada ano vigente (Documento M100S-19 à M100S-25): amicacina (30 µg), ampicilina/sulbactam, (10/10 µg), ceftazidima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), doxaciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), piperacilina/tazobactam (100 /10 µg), sulfametoxazol/ trimetropim (1,25/23,75 µg), polimixina B (300 unidades) e tobramicina (10 µg). Todos os discos utilizados foram provenientes do mesmo fabricante (Oxoid, Cambridge, Inglaterra).

Preparou-se uma suspensão bacteriana (inóculo) a partir da seleção de colônias isoladas de uma placa de Petri com crescimento prévio de 18 a 24 horas que então foi comparada com turvação padrão 0,5 na escala de McFarland (DensiCHECK™ Plus – Biomerieux). Logo após, essa suspensão foi inoculada em placa contendo meio de cultura ágar Mueller-Hinton (Biomerieux) e 5 minutos após foi feita a aplicação dos discos de antimicrobianos. Em seguida, a placa foi incubada em posição invertida em estufa a 35°C, por 16 à 18h. A interpretação dos halos de inibição foi realizada conforme as recomendações vigentes do “Clinical and

Laboratory Standards Institute” (CLSI) para cada ano correspondente (Documento M100S-19 à M100S-25).

4.4.2 Métodos genotípicos

4.4.2.1 Obtenção do DNA microbiano

Para a obtenção do DNA bacteriano, foi utilizado o método de choque térmico descrito por Vannechoutte et al. (1995) e Baratto & Megiolaro (2012), com modificações, a partir de cultivo em meio sólido (ágar MacConkey). Primeiramente, duas a três colônias de uma cultura pura, coletadas com alça de inoculação, foram ressuspensas em 100 µL de água estéril ultrapura (Milli-Q, São Paulo, Brasil), em microtubo de 1,5 mL. Após esse processo as suspensões foram submetidas a banho fervente por 5 min e, em seguida, a choque térmico em banho de gelo por 5 min. O procedimento de fervura e resfriamento foi repetido, seguido de centrifugação (Eppendorf 5415 R, Hamburgo, Alemanha) a 8.000 x g por 10 min. Ao final do processamento, o sobrenadante foi coletado e o precipitado, descartado.

O sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi qualificado e quantificado por meio de análise espectrofotométrica (leituras a 260 e 280 nm) em aparelho Spectrum 2000 UV (Taiwan, China) e, em seguida, armazenado a -20°C até o uso subsequente.

4.4.2.2 Avaliação da viabilidade do DNA microbiano.

Para verificar a viabilidade do método de extração, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR; Polymerase Chain Reaction) do DNA bacteriano obtido. Utilizou-se o par de iniciadores específicos para o ABC - *gltA*-F (5'-AATTTACAGTGGCACATTAGGTCC-3') e *gltA*-R (5'-GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG-3') - que propiciam a amplificação de um segmento único de 722 pb do gene *gltA*, codificante para a citrato sintase bacteriana. A termociclagem foi realizada através de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 62°C por 30 seg e

72°C por 1 min. Uma extensão final será conduzida a 72°C por 10 min (BARTUAL et al., 2005).

4.4.2.3 Identificação de genes associados à produção de oxacilinases

Foi realizada Multiplex PCR, empregando-se os iniciadores descritos anteriormente por Higgins e colaboradores (2010) e Woodford e colaboradores (2006), apresentados na tabela 1, para a investigação da presença dos genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like} nos isolados selecionados. As reações foram estabelecidas em volume final de 50 µL, acrescentando-se, aproximadamente, 50 a 500 ng de DNA extraído à mistura de reagentes contendo 1 U Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 200 µM dNTPs (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 20 pmols de cada iniciador (DNA Express -São Paulo, Brasil) e 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen). As termociclagens foram realizadas em aparelho XP Cyler (BIOER Technology, Tóquio, Japão) e consistiram de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos envolvendo 1 min a 94°C, 30 seg a 52°C e 1 min a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 min (WOODFORD et al., 2006).

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificantes de oxacilinases

Alvo	Sequência (5' a 3')	Produto (pb)	Referência
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCCAT	501	Woodford et al. (2006)
<i>bla</i> _{OXA-24-like}	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246	Woodford et al. (2006)
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	353	Woodford et al. (2006)
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599	Woodford et al. (2006)
<i>bla</i> _{OXA-143-like}	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT TAATCTTGAGGGGGCCAACC	149	Higgins et al. (2010)

Para a confirmação da efetividade do método de detecção dos genes alvos, foram utilizadas, como controles positivos da reação, cepas padrão do ABC

produtoras de oxacilinas provenientes da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ) identificadas como 7892 (*bla*_{OXA-24-like}), 7740 (*bla*_{OXA-58-like}) e 7572 (*bla*_{OXA-23-like} e *bla*_{OXA-143-like}). Como controle negativo foi utilizada A cepa *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* ATCC (American Type Culture Collection) 19606, sensível aos carbapenêmicos.

4.4.2.4 Identificação da sequência de inserção IS*Aba*1

A investigação da presença da sequência de inserção IS*Aba*1 nos isolados selecionados e sua associação aos genes *bla*_{OXA-23-like} e *bla*_{OXA-51-like} foi realizada via PCR empregando-se os iniciadores descritos anteriormente por Segal e colaboradores (2005) e Turton e colaboradores (2006). As sequências dos oligonucleotídeos e o tamanho dos produtos de reação encontram-se indicados na tabela 2.

As reações foram estabelecidas em volume final de 50 µL acrescentando-se, aproximadamente, 30 ng de DNA extraído à mistura de reagentes contendo 10 pmols de cada iniciador (Invitrogen), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 200 µM dNTPs (GE Healthcare) e 1 U Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As termociclagens foram realizadas em aparelho XP Cyler (BIOER Technology) conforme os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na investigação da sequência ISAb_{a1}

Alvo	Sequência (5' a 3')	Produto (pb)	Referência
ISAb _{a1}	CACGAATGCAGAAGTTG CGACGAATACTATGACAC	548	Segal et al., (2005)
ISAb _{a1} + blaOXA-23-like	GTGTCATAGTATTCGTCG ATTTCTGACCGCATTTCAT	875	Turton et al., (2006)
ISAb _{a1} + blaOXA-51-like	CAAGGCCGATCAAAGCATTA GTGTCATAGTATTCGTCG	359	Turton et al., (2006)

A cepa *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* ATCC 19606, sensível aos carbapenêmicos, foi utilizada como controle negativo.

4.4.2.5 Eletroforese

Foi realizada eletroforese submersa (tampão TBE) em gel de agarose, a 1% contendo 0,5 ug/mL de brometo de etídeo, dos produtos das reações de PCR. Na sequência, a confirmação desses ocorreu via exposição à luz ultravioleta em transiluminador (MiniBis-Pro Photodocumentation System – DNR Bio-Image Systems Ltd., Jerusalém, Israel), seguido de registro digitalizado.

Além de serem utilizados controles positivos e negativos, foi realizada a confirmação da obtenção dos produtos (“amplicons”) correspondentes aos segmentos planejados por meio da comparação de tamanhos com um padrão disponível comercialmente (100 pb Ladder, Fermentas, Burlington, Canadá) também exposto a mesma condição de eletroforese. Sendo assim, pela análise dos perfis eletroforéticos obtidos foi determinada a ocorrência dos elementos genéticos investigados.

4.5 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), conforme diretrizes estabelecidas na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e complementares, sob parecer número 788.455.

Os dados relacionados ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos correspondentes ao período 2009 a 2015 foram autorizados e coletados junto a SCIH do HDH. As cepas bacterianas foram isoladas, armazenadas e analisadas mantendo-se a identificação do paciente correspondente sob sigilo absoluto, sendo apenas identificadas por codificação definida exclusivamente para a pesquisa.

Nenhum procedimento realizado exclusivamente para os fins da pesquisa teve qualquer impacto aos pacientes acometidos no período de condução do estudo, não influenciando a conduta clínica e o prognóstico. Todos os preceitos éticos e os requisitos dispostos na Resolução CNS 466/2012 e complementares, que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, foram estritamente observados pelos pesquisadores.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Conforme as normas do Programa de Pós Graduação em Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, este capítulo será apresentado na forma de artigo científico que será encaminhado para publicação no periódico “*Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*”.

Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii: role of the genetic elements *bla*_{OXA}
and IS*Aba1* in resistance to carbapenem antibiotics in the hospital setting

ABSTRACT

Introduction: Members of the *Acinetobacter* genus are key pathogens that cause healthcare-associated infections. Oxacillinases are the primary factor underlying resistance to carbapenem antibiotics. Higher rates of carbapenem hydrolysis may derive from insertion sequences, such as the IS*Aba1* sequence, near the *bla*_{OXA} genes. The present study examined the occurrence of the genetic elements *bla*_{OXA} and IS*Aba1* and their relationship with susceptibility to carbapenems in clinical isolates belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. **Methods:** Isolates identified over six consecutive years in a general hospital in Joinville, Southern Brazil, were evaluated. The investigation of five families of genes encoding oxacillinases and the IS*Aba1* sequence location relative to the *bla*_{OXA} genes was conducted using polymerase chain reaction. **Results:** All isolates presented the *bla*_{OXA-51-like} (n = 78) gene and 91% tested positive for *bla*_{OXA-23-like} (n = 71). The presence of IS*Aba1* was exclusively detected in the isolates carrying the *bla*_{OXA-23-like} gene. All isolates in which IS*Aba1* was found upstream of the *bla*_{OXA-23-like} gene (n = 69) showed resistance to carbapenems, while the only isolate in which IS*Aba1* was not located near the *bla*_{OXA-23-like} gene was sensitive to carbapenems. Another *bla*_{OXA-23-like} positive isolate was inconclusive regarding the IS*Aba1* sequence position. The isolates exclusively carrying the *bla*_{OXA-51-like} gene (n = 7) showed sensitivity to carbapenems. **Conclusions:** The IS*Aba1* sequence located upstream of the *bla*_{OXA-23-like} gene was strongly associated with carbapenem resistance in isolates of the *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex in the hospital center studied.

Keyword: *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *bla*_{OXA}. IS*Aba*1. Carbapenem antibiotics.

INTRODUCTION

The infectious diseases termed healthcare-associated infections (HAI) are increasingly affecting public and private healthcare systems and raising not only hospital costs but also the morbidity and mortality rates of affected patients^{(1) (2) (3)}.

The bacterial genus *Acinetobacter* is recognized as a key HAI-causing pathogen that is associated with high mortality rates in hospital settings^{(2) (4)}. *Acinetobacter* has a great capacity to spread and develop new antibiotic resistance mechanisms⁽⁵⁾. Due to these properties, numerous HAI outbreaks caused by multidrug-resistant representatives of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex have been reported in several countries, including Brazil^{(2) (5) (6)}.

Oxacillinase-type (OXA) carbapenemases (enzymes classified in Ambler class D) are the primary factors responsible for resistance to carbapenem antibiotics worldwide^{(7) (8)}. Approximately 150 variants have already been described, and at least 45 show carbapenem-hydrolyzing activity⁽⁷⁾. OXAs are genetically divided into six subgroups. The most commonly identified examples are *bla*_{OXA-23-like} (OXA-23, OXA-27 and OXA-49), *bla*_{OXA-24-like} (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 and OXA-72), *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like} (OXA-143, OXA-231 and OXA-253), *bla*_{OXA-235} and *bla*_{OXA-51-like}. The latter subgroup is intrinsic to the *A. baumannii* species^{(8) (9)}. Higher carbapenem hydrolysis rates reportedly result from the acquisition of insertion sequences that affect the expression of the *bla*_{OXA} genes that encode the oxacillinases^{(10) (11) (12) (13) (14)}. These elements are the smallest and most abundant transposable elements and are capable of causing mutations and rearrangements of the

genome, thereby contributing to the spread of resistance and virulence determinants in various bacterial species⁽¹⁵⁾.

Different insertion sequences (IS) have been described in the *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex in association with specific genes; these sequences play a key role in the development of carbapenem resistance⁽¹⁵⁾. The IS termed IS*Aba1* ("Insertion Sequence *Acinetobacter baumannii* 1") belongs to the IS4 family and has been identified in association with several antibiotic resistance genes in the *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex^{(14) (15)}. A role for IS*Aba1* in increasing gene expression was demonstrated for the *bla*_{ampC} gene encoding cephalosporinase and the *bla*_{OXA-23-like} genes encoding one of OXAs that hydrolyze carbapenems⁽¹⁵⁾. Some studies have also linked the presence of the IS*Aba1* sequence upstream of the *bla*_{OXA-51-like} gene to carbapenem resistance phenotypes^{(4) (15)}.

The diversity of the genetic elements involved in the resistance of the *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex to antibiotics has encouraged the need for studies about these determinants of resistance^{(1) (2) (4) (16) (17) (18) (19)}. Based on the above findings, the present study examined the occurrence of the genetic elements *bla*_{OXA} and IS*Aba1* in clinical isolates belonging to the *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex and their association with the phenotypic susceptibility profile to carbapenem antibiotics.

METHODS

Selection of clinical isolates and ethical aspects

The study was conducted at Dona Helena Hospital, which is a private general hospital with 189 beds, and in the Molecular Biology Laboratory of the University of Region of Joinville (UNIVILLE); both are located in Joinville, state of Santa Catarina (SC), Brazil.

Clinical isolates belonging to the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex identified over six consecutive years starting in March 2009 were included in the study. Isolates related to HAI (healthcare-associated infection after 48 hours of admission), colonization (presence of microorganism without clinical signs of related infection) and surveillance culture upon admission (detection of colonization in patients referred from other healthcare institutions at the time of hospital admission) according to the criteria defined by the Hospital Infection Control Service of the hospital center studied were included in the study. Only the first isolate obtained from patients with two or more isolates derived from the same anatomical site during the same period of hospitalization was considered for the purposes of the study. All isolates were identified by the Microscan Walkaway automated system (Siemens, Munich, Germany) complemented by Gram staining.

This study was evaluated and approved by the Research Ethics Committee of UNIVILLE (Opinion 788.455).

Antibiotic susceptibility analysis

The determination of the antibiotic susceptibility profile was performed using the disk-agar diffusion method (Kirby and Bauer)⁽²⁰⁾. The interpretation of the inhibition halos was conducted according to current recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁽²¹⁾ for each corresponding year.

Imipenem and meropenem discs with 10 µg of each antibiotic were used. Simultaneously, other classes of antibiotics were tested in the following amounts indicated by the CLSI: amikacin (30 µg), ampicillin/sulbactam (10/10 µg), ceftazidime (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), doxycycline (30 µg), gentamicin (10 µg), piperacillin/tazobactam

(100/10 µg), polymyxin B (300 units), sulfamethoxazole/trimethoprim (1.25/23.75 µg) and tobramycin (10 µg). All discs were from the same manufacturer (Oxoid, Cambridge, UK).

Bacterial DNA preparation and evaluation

The heat shock method was used to prepare bacterial DNA from a pure culture grown in MacConkey agar⁽²²⁾. Initially, three colonies collected using a bacteriological loop were resuspended in 100 µL of ultrapure sterile water (Milli-Q, São Paulo, Brazil). The suspension was subjected to a boiling water bath for 5 min and then cold shocked in an ice bath for 5 min. The boiling and cooling procedures were repeated, followed by centrifugation at 8,000 x g for 10 min. The supernatant containing the bacterial DNA was evaluated through spectrophotometric readings at 260 and 280 nm and then stored at -20°C.

The extracted bacterial DNA was assessed by polymerase chain reaction (PCR) to determine its viability for use in the subsequent genotypic analyses. A pair of primers specific for the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex [gltA-F (5'-AATTTACAGTGGCACATTAGGTCC-3') and gltA-R (5'-GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG-3')] was used to amplify a single 722 base pair (bp) fragment of the *gltA* gene encoding the bacterial citrate synthase⁽²³⁾. The thermocycling conditions consisted of an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 62°C for 30 seconds and 72°C for 1 min. A final extension was conducted at 72°C for 10 min⁽²³⁾.

Investigation of the genetic elements associated with oxacillinase production

The investigation of the occurrence of the *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} and *bla*_{OXA-143-like} genes in the selected isolates was performed using multiplex PCR with the primers outlined in **Table 1**⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾. The reactions were conducted in a final volume of 50 µL and contained approximately 50 to 500 ng of extracted DNA and a reagent mixture with 1 U Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 200 µM dNTPs (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 20 pmol of each primer (DNA Express, São Paulo, Brazil) and 1.5 mM of MgCl₂ (Invitrogen). The reactions were performed in an XP Cyclor device (BIOER Technology, Tokyo, Japan) and consisted of an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 30 seconds at 52°C and 1 min at 72°C. The final extension was performed at 72°C for 10 min⁽²⁴⁾.

The investigation of the presence of the IS*Aba1* promoter sequence in the isolates and its association with the *bla*_{OXA-23-like} and *bla*_{OXA-51-like} genes was performed using PCR⁽¹²⁾ ⁽²⁶⁾ ⁽²⁷⁾. The primer sequences and the sizes of the expected reaction products are outlined in **Table 1**. Excluding the primers (10 pmol of each primer per reaction), all other components were used in quantities identical to those described for the multiplex PCR and the reactions were performed using the same thermocycler. The initial denaturation was performed at 94°C for 3 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, hybridization at 50°C for 1 min and extension at 72°C for 2 min. The final extension was performed at 72°C for 5 min.

TABLE 1 - Primers used to detect genes encoding oxacillinases and IS*Aba1*.

Target	Sequence (5' to 3')	Product (bp)	Reference
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	Woodford et al. ⁽²⁴⁾
	ATTTCTGACCGCATTTCAT		
<i>bla</i> _{OXA-24-like}	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246	Woodford et al. ⁽²⁴⁾
	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	Woodford et al. ⁽²⁴⁾
	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	Woodford et al. ⁽²⁴⁾
	CCCCCTGCGCTCTACATAC		
<i>bla</i> _{OXA-143-like}	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	149	Higgins et al. ⁽²⁵⁾
	TAATCTTGAGGGGGCCAACC		
IS <i>Aba1</i>	CACGAATGCAGAAGTTG	548	Segal et al. ⁽¹²⁾
	CGACGAATACTATGACAC		
IS <i>Aba1</i> + <i>bla</i> _{OXA-23-like}	GTGTCATAGTATTCGTCG	875	Turton et al. ⁽²⁷⁾
	ATTTCTGACCGCATTTCAT		
IS <i>Aba1</i> + <i>bla</i> _{OXA-51-like}	CAAGGCCGATCAAAGCATTA	359	Turton et al. ⁽²⁷⁾
	GTGTCATAGTATTCGTCG		

bp: base pairs

The PCR products were subjected to submerged electrophoresis (TBE buffer, 10 V/cm) in a 1% agarose gel with 0.5 µg/mL ethidium bromide. The expected fragments were confirmed by exposure to ultraviolet light (300 nm) in a transilluminator followed by scanning.

Standard strains of the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex from the collection of cultures of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz/Rio de Janeiro, RJ, Brazil) labeled 7892 (*bla*_{OXA-24-like}), 7740 (*bla*_{OXA-58-like}) and 7572 (*bla*_{OXA-23-like} and *bla*_{OXA-143-like}) were used as positive controls. The carbapenem-sensitive *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* American Type Culture Collection (ATCC) 19606 strain was used as the negative control.

RESULTS

Seventy-eight clinical isolates belonging to the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex derived from 60 patients (12 individuals contributed with two or more isolates) were employed in the phenotypic and genotypic analyses established for the study. All isolates were positive for amplification of the *bla*_{OXA-51-like} gene fragment. These isolates were identified in clinical samples from patients with HAI (66.7%), surveillance culture upon admission (15.4%) and colonization of patients (17.9%).

The isolates were collected from bronchoalveolar lavages (38.5%), wound secretions (12.8%), rectal swabs (12.8%), blood (9%), urine (6.4%) and other types of samples with lower frequencies (20.5%). The departmental distribution of isolates in the studied Hospital Center showed that 53.8% were derived from the intensive care unit (ICU), 29.5% from the inpatient units, 10.3% from the emergency room and 6.4% from the surgical center. The temporal evolution in relation to the sectors and types of samples corresponding to the analyzed isolates is shown in **Table 2**.

TABLE 2 - Distribution of clinical isolates according to the type of sample and department of the Hospital Center over the six years analyzed in the study.

	YEAR						Total
	1	2	3	4	5	6	
ISOLATES [n (%)]	16	12	7	12	20	11	78
HAI	14 (87.5)	10 (83.4)	5 (71.4)	11 (91.6)	9 (45)	3 (27.3)	52
Colonization	2 (12.5)	2 (16.6)	2 (28.6)	1 (8.4)	4 (20)	3 (27.3)	14
Surveillance	np	np	-	-	7 (35)	5 (45.4)	12
TYPE OF SAMPLE [n (%)]							
Bronchoalveolar lavage	8 (50)	4 (33.3)	2 (28.6)	8 (66.7)	6 (30)	2 (18.2)	30
Wound secretion	-	3 (25)	1 (14.3)	1 (8.3)	2 (10)	3 (27.2)	10
Rectal swab	-	-	-	-	6 (30)	4 (36.4)	10
Blood	1 (6.2)	2 (16.7)	1 (14.3)	2 (16.7)	1 (5)	-	7
Urine	3 (18.8)	1 (8.3)	-	-	1 (5)	-	5
Others:	4 (25)	2 (16.7)	3 (42.8)	1 (8.3)	4 (20)	2 (18.2)	16
Cutaneous fistula	1	-	-	-	-	-	1
Tissue fragment	-	-	1	-	1	1	3
Bone fragment	-	-	1	-	-	-	1
Abdominal fluid	-	-	1	-	-	-	1
Peritoneal fluid	1	-	-	-	-	-	1
Pleural fluid	1	-	-	-	1	-	2
Cerebrospinal fluid	-	1	-	1	-	-	2
Surgical secretion	-	-	-	-	1	-	1
Abscess secretion	1	1	-	-	-	1	3
Trochanter secretion	-	-	-	-	1	-	1
HOSPITAL DEPARTMENT [n (%)]							
ICU	12 (75)	6 (50)	2 (28.6)	11 (91.7)	8 (40)	3 (27.3)	42
Inpatient Units	3 (18.8)	4 (33.4)	3 (42.8)	1 (8.3)	6 (30)	6 (54.5)	23
Emergency Room	-	1 (8.3)	-	-	5 (25)	2 (18.2)	8
Surgical Center	1 (6.2)	1 (8.3)	2 (28.6)	-	1 (5)	-	5

np: not performed

Phenotypic analysis

The evaluation of the antibiotic susceptibility profile showed that 88.5% (n = 69) of the isolates were resistant to the carbapenems imipenem and meropenem (**Figure 1**). Simultaneously, the ratio of resistance of the group of isolates analyzed to the other antibiotics tested was distributed as follows: ciprofloxacin, 88.3% (68/77); piperacillin/tazobactam, 87.2% (68/78); sulfamethoxazole/trimethoprim, 74.3% (52/70); ceftazidime, 68.4% (52/76); ampicillin/sulbactam, 41% (32/78); amikacin, 41% (32/78); tobramycin, 28.4% (21/74); doxycycline, 13.7% (10/73) and gentamicin, 10.8% (8/74). All isolates exhibited full sensitivity to polymyxin B.

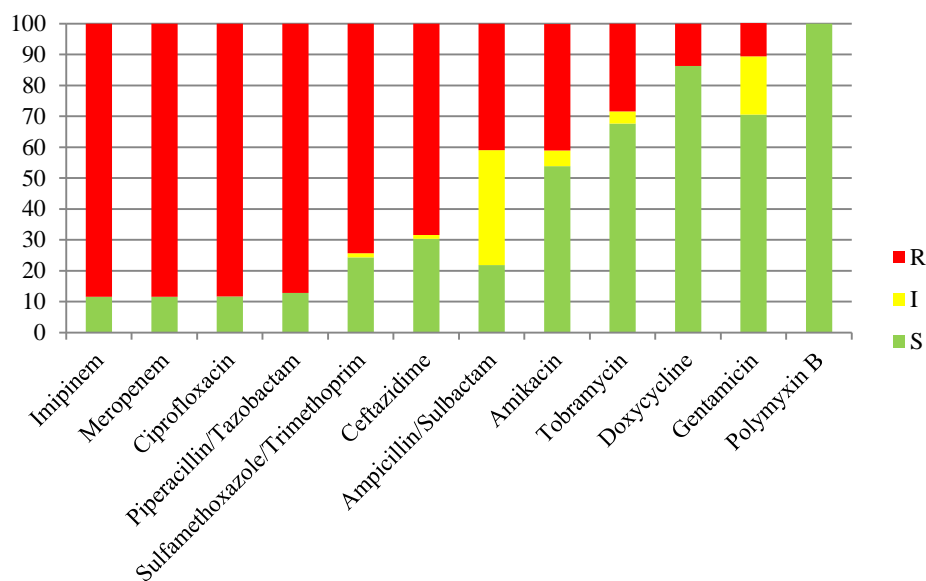


FIGURE 1 - *In vitro* susceptibility profile of *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* clinical isolates: (R) resistant, (I) intermediate and (S) sensitive.

Genotypic evaluation

All extracted DNA samples enabled the amplification of the *gltA* gene segment and were considered viable for the subsequent genotypic analyses. **Figure 2** exemplifies the electrophoretic pattern resulting from the PCR for the investigation of the main subgroups of genes encoding oxacillinases and *ISAbal* in the clinical isolates of the present study.

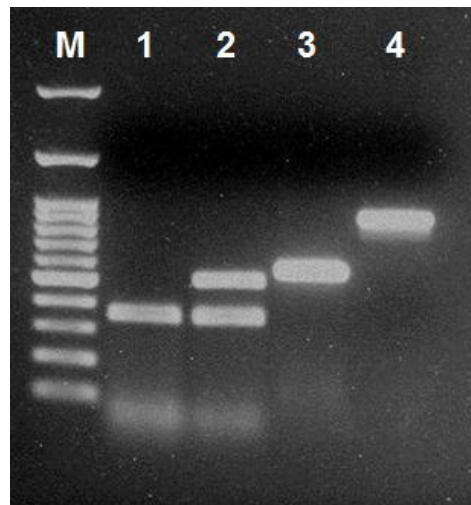


FIGURE 2 - Identification of genetic elements associated with the production of oxacillinases via PCR: (M) Molecular marker (100 bp, Fermentas, Ontario, Canada); (1) *bla*_{OXA-51-like} (353 bp); (2) *bla*_{OXA-51-like} (353 bp) and *bla*_{OXA-23-like} (501 bp); (3) *ISAbal* (548 bp) and (4) *ISAbal* + *bla*_{OXA-23-like} (875 bp).

A total of 71 (91%) of the isolates phenotypically identified as belonging to the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex showed the *bla*_{OXA-23-like} and *bla*_{OXA-51-like} genes, whereas 7 (9%) exclusively amplified *bla*_{OXA-51-like}. The *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} and *bla*_{OXA-143-like} genes were not detected in the present study.

All isolates carrying the *bla*_{OXA-23-like} gene (n = 71) also had the *ISAbal* promoter sequence; this sequence was located upstream from the *bla*_{OXA-23-like} gene in 69 (97.2%) isolates. A single isolate (1.4%) carried *ISAbal* that was not associated with the location of

*bla*_{OXA-23-like}, while another isolate (1.4%) proved inconclusive regarding the insertion position. The *ISAbal* sequence was not observed upstream of the *bla*_{OXA-51-like} gene in the analyzed isolates.

Evaluation of the association between genetic markers and phenotypic resistance to carbapenems

All isolates with *ISAbal* located upstream of the *bla*_{OXA-23-like} gene (n = 69) showed resistance to imipenem and meropenem and were identified during the six consecutive years of observation (93.7%, 91.7%, 100%, 91.7%, 85% and 72.7% of the resistant isolates in each year). Conversely, the only isolate wherein *ISAbal* was not coupled to *bla*_{OXA-23-like} showed sensitivity to carbapenems and was identified in year 1. The isolates exclusively containing *bla*_{OXA-51-like} (n = 7; 1 in year 2, 1 in year 4, 2 in year 5 and 3 in year 6) also showed full sensitivity to imipenem and meropenem.

DISCUSSION

Carbapenems are the antibiotics of choice for the treatment of infections caused by *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex when these bacteria become resistant to other β -lactam antibiotics; however, resistance to carbapenems has increased, thereby limiting their use⁽¹⁵⁾. The present study demonstrated that the presence of the *ISAbal* promoter sequence associated with the *bla*_{OXA-23-like} gene in *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* was strongly associated with resistance to carbapenem antibiotics in the hospital setting.

The species *A. baumannii* is the most important representative of the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex and is considered the leading pathogen of the *Acinetobacter* genus in

health institutions worldwide^{(10) (16)}. Small genomic differences exist among the species of this genus and have been reported by several authors; however, species 1 (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), genospecies 3 and genospecies 13TU are closely related and are collectively termed the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex due to the difficulty in separating them using conventional tests^{(16) (28)}. Several authors reported that *A. baumannii* species identification may be confirmed by detecting the presence of the *bla*_{OXA-51} gene because it naturally occurs in the *A. baumannii* chromosome^{(13) (29) (30)}. This gene is intrinsic to the species and has been identified in a wide collection of isolates of the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex collected from various geographic areas^{(13) (27) (28) (29) (31) (32)}. Thus, phenotypically identified isolates that possess the *bla*_{OXA-51-like} gene were considered members of the complex in the present study. Conversely, recent studies have reported the plasmid-encoded carbapenemase OXA-51 in clinical isolates of *A. nosocomialis* and in other genospecies not corresponding to *A. baumannii*^{(17) (33) (34) (35)}.

A. baumannii became particularly problematic due to its increased prevalence and resistance to carbapenem antibiotics⁽³⁶⁾. In the present study, 88.5% (69/78) of the isolates showed resistance to carbapenems. The resistance rates of *Acinetobacter sp.* to carbapenems increased from 6.4%, 12.6% and 0% between 1997 and 1999 to 84.9%, 71.4% and 50.0% between 2008 and 2010 in Argentina, Brazil and Chile, respectively, according to the Antimicrobial Surveillance Program in Latin America^{(36) (37)}. A cohort study conducted in five ICUs of tertiary hospitals of the metropolitan area of the city of Goiânia, Goiás (GO), Brazil, showed a high rate of *A. baumannii* resistance to carbapenems (73.4%), which is a higher result than the means reported by other Brazilian institutions (25 to 45%)⁽³⁸⁾.

Oxacillinase production corresponding to *bla*_{OXA-23-like} gene expression is the most common carbapenems-resistance mechanism in *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* reported in various countries, including Bulgaria, China, Iraq, Afghanistan, France and Polynesia⁽³⁹⁾. In

the present study, 91% (71/78) of the isolates were positive for amplification of the *bla*_{OXA-23-like} gene. A study conducted by Carvalho et al.⁽¹⁷⁾ in 10 public and private hospitals in the city of Rio de Janeiro from 2005 to 2007 showed similar results, with detection of the *bla*_{OXA-23-like} gene in 96% of the isolates. This rate is higher than the rates observed in studies conducted in other countries, both nationwide, such as in Taiwan (21.1%), or restricted to a few local hospitals, such as in Romania (84.6%), Tunisia (82%), Greece (72.4%) and Italy (40%).

The expression of *bla*_{OXA} genes may be increased by the presence of the *ISAbal* sequence upstream of the enzyme-encoding gene, which provides higher levels of resistance to carbapenems⁽¹⁴⁾. The presence of *ISAbal* was detected in all isolates positive for *bla*_{OXA-23-like} gene amplification in the present study (n = 71). Furthermore, all isolates wherein *ISAbal* was located upstream of the *bla*_{OXA} gene (n = 69) showed resistance to carbapenems. This profile of a strong association between *ISAbal* and *bla*_{OXA-23-like} was repeated during the six years of observation, which suggests the occurrence of cross infection, dissemination and long-term permanence of this resistance mechanism in the hospital center studied. The only isolate wherein *ISAbal* was not located upstream of the *bla*_{OXA-23-like} gene showed sensitivity to carbapenems. Thus, the presence of *bla*_{OXA-23-like} without the *ISAbal* promoter sequence may not be sufficient to cause carbapenem hydrolysis, as previously reported by Carvalho et al.⁽⁴⁰⁾.

OXA-51 carbapenemases encoded by intrinsic (chromosomal) genes have a weak capacity to hydrolyze carbapenems^{(11) (41)}. The presence of *ISAbal* may provide a strong promoter for the *bla*_{OXA-51-like} gene, thereby increasing its expression and causing resistance⁽⁴²⁾^{(43) (44)}. A study conducted in the United Kingdom by Turton et al.⁽²⁷⁾ showed that carbapenem hydrolysis by isolates carrying the *bla*_{OXA-51-like} gene only occurred in bacteria wherein *ISAbal* was upstream of the gene, demonstrating that this IS acted as a promoter for the expression of this gene. Antonio et al.⁽²⁶⁾ reported in their study performed in hospitals of the

Southeast and South regions of Brazil from 2004 to 2008 that IS*Aba*1 was not observed upstream of the *bla*_{OXA-51-like} gene; none of the isolates analyzed showed the carbapenem-resistance phenotype. The results in our study were similar because only 9% (7/78) of the isolates exclusively amplified *bla*_{OXA-51-like} and none amplified IS*Aba*1 concomitantly; moreover, all of these isolates were sensitive to carbapenems. This finding reinforces the hypothesis that the absence of IS*Aba*1 or its presence in a region not upstream of the *bla*_{OXA-51-like} gene renders a very low or nonexistent carbapenem hydrolysis capacity in *A. baumannii* isolates without other *bla*_{OXA} genes.

The emergence of carbapenem resistance has limited the treatment of HAIs caused by *A. baumannii*^{(36) (38)}. In the present study, 41% of the isolates showed resistance to ampicillin/sulbactam, which is lower than the 85.2% rate reported by Carvalho et al.⁽⁴⁵⁾ from 2002 to 2010 in the ICU of a public institution in the city of Teresina, Piauí (PI), Brazil. The use of ampicillin/sulbactam has been effective for the treatment of multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* in systemic infections; however, a steady decline in susceptibility rates has been reported in recent decades^{(46) (47)}. Furthermore, in Latin America *A. baumannii* has been commonly reported as MDR with high rates of resistance to other antibiotics in addition to carbapenems, including ceftazidime, piperacillin/tazobactam and ciprofloxacin, thereby seemingly ranking among the world's largest⁽³⁸⁾. In a study conducted using 155 *A. baumannii* isolates from 11 Brazilian states from 2008 to 2011, Chagas et al.⁽³⁶⁾ demonstrated that most isolates also showed resistance to more than five classes of antibiotics in addition to carbapenems. The highest rates were observed for ciprofloxacin, cefepime and piperacillin/tazobactam, with 99.4% resistant isolates, followed by ceftazidime (97.4%), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.9%) and amikacin (11.6%); however, the isolates did display sensitivity to polymyxin B. In the present study, 88.3%, 87.2% and 68.4% of the isolates showed resistance to ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam and ceftazidime,

respectively, and all analyzed isolates were sensitive to polymyxin B. However, higher rates of resistance were observed for sulfamethoxazole/trimethoprim (74.5%) and amikacin (41%). These data suggest that the use of polymyxins should be highlighted as a therapeutic option for HAIs caused by *A. baumannii*⁽⁴⁸⁾. Polymyxin B and colistin, which have similar actions, are old drugs with nephrotoxicity and neurotoxicity that are considered to be effective in treating infections caused by carbapenem-resistant *A. baumannii*⁽⁴⁹⁾. However, some studies have already shown resistance to that class of antibiotics^{(36) (50)}.

A. baumannii also stands out because it is an opportunistic pathogen in HAI episodes, especially in ICUs⁽³⁴⁾. In particular, invasive mechanical ventilation (a life support method widely used in ICUs) is usually associated with nosocomial infection by *A. baumannii*⁽⁵¹⁾. In a study performed using 500 isolates from 30 hospitals of 10 Cuban provinces from 2010 to 2012, Quiñones et al.⁽³⁷⁾ demonstrated that the hospital unit with the highest number of cases of *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* infection was the ICU (60.2%) and that the respiratory tract had the highest rate of positive cultures (38.6%). Godoy et al.⁽³⁸⁾ showed that the lungs were also the most common site of infection with *A. baumannii* among the patients monitored in the five ICUs of Goiânia (53.1% of cases). Similar results were observed in our study in which 53.8% (42/78) of the isolates were derived from the ICU and the majority of positive cultures were derived from bronchoalveolar lavages (66.7%; 28/42).

A. calcoaceticus-*A. baumannii* colonization should be analyzed because it may precede cases of infection and contribute to the endemicity of this agent in healthcare institutions in addition to being a key microorganism related to HAIs⁽⁵²⁾. In the present study, 17.9% (14/78) of the isolates were related to patient colonization, which was a higher result than that reported by Godoy et al.⁽³⁸⁾, in which a 9.4% *A. baumannii* colonization rate was observed. Surveillance cultures of patients transferred from other institutions were adopted in the hospital studied during year 3. A total of 12 cases positive for *A. baumannii* were

confirmed, including 7 in year 5 (6 rectal swab and 1 wound secretion isolates) and 5 in the following year (4 isolates derived from rectal swabs and 1 from tissue fragments). All of the cases were identified within 48 hours of admission.

Some limitations may be identified in our study. The number of isolates was relatively small despite the six years covered by the analyses, and the study was performed in a single hospital center. The included patients had several comorbidities and some suffered multiple hospital admissions, which complicated the evaluation of the impact on the numbers related to colonization. Therefore, we recommend conducting similar multicenter studies involving a greater number of hospitals and evaluating the clinical and epidemiological characteristics associated with HAIs and the risk factors. Furthermore, we propose an investigation of the association between genetic profiles related to resistance and the severity and clinical outcomes of the affected patients using standardized clinical scores. Finally, we consider it pertinent to conduct the genotyping of isolates identified in the hospital to examine the clonal relationship between resident strains and those possible community-acquired strains, thereby highlighting possible flaws in infection control.

Thus, the present study provides data on the prevalence of isolates belonging to the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex carrying genetic elements associated with carbapenems resistance. The emergence and spread of variants of the *bla*_{OXA} gene encoding carbapenemases and of ISs capable of increasing *bla*_{OXA} expression in *A. baumannii* in Brazil should alert the medical community and health managers to the potential for the occurrence of outbreaks of carbapenem-resistant isolates, especially those with the IS*Aba1* sequence upstream of the *bla*_{OXA-23-like} gene.

CONFLICTS OF INTEREST: All authors reported no conflicts of interest relevant to this article.

REFERENCES

- 1 - Lin L, Nonejuie P, Munguia J, Hollands A, Olson J, Dam Q, et al. Azithromycin synergizes with cationic antimicrobial peptides to exert bactericidal and therapeutic activity against highly multidrug-resistant Gram-negative bacterial pathogens. *EBioMedicine* 2015; 2:690-698.
- 2 - Kuo SC, Lee YT, Lauderdale TLY, Huang WC, Chuang MF, Chen CP, et al. Contribution of *Acinetobacter*-derived cephalosporinase-30 to sulbactam resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* 2015; 6:1-9.
- 3 - Freire ILS, Menezes LCC, Sousa NML, Araújo RO, Vasconcelos QLDAQ, Torres GV. Epidemiologia das infecções relacionadas à assistência à saúde em Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica. *Rev Bras Ciên Saúde* 2013; 11:9-15.
- 4 - Pagano M, Martins AF, Machado ABMP, Barin J, Barth AL. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the IS*Aba1* upstream *bla*_{OXA-51-like} gene in Porto Alegre, southern Brazil. *Epidemiol Infect* 2012, 141:1-4.
- 5 - Chen T, Lee Y, Kuo S, Hsueh P, Chang F, Siu L, et al. Emergence and distribution of plasmids bearing the *bla*_{OXA-51-like} gene with an upstream IS*Aba1* in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 11:4575-4581.
- 6 - Tognim MC, Andrade SS, Silbert S, Gales AC, Jones RN, Sader HS. Resistance trends of *Acinetobacter spp.* in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *International J Infect Dis* 2004; 8:284-291.
- 7 - Kusradze I, Diene SM, Goderdzishvili M, Rolain JM. Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38:164-168.

- 8 - Opazo A, Domínguez M, Bello H, Amyes SG, Rocha GG. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries* 2012; 6:311-316.
- 9 - Higgins PG, Pérez FJL, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:2121-2126.
- 10 - Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:538-582.
- 11 - Nowak P, Paluchowska P, Budak A. Distribution of *bla*_{OXA} genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. *New Microbiol* 2012; 35:317-325.
- 12 - Segal H, Garny S, Elisha BG. Is IS*Aba1* customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett* 2005; 243:425-429.
- 13 - Turton JF, Woodford N, Glover 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. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2974-2976.
- 14 - Mugnier PD, Poirel L, Nordmann P. Functional analysis of insertion sequence IS*Aba1*, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 2009; 191:2414-2418.
- 15 - Martinez P, Mattar S. Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the IS*Aba1*-*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} and IS*Aba1*-*bla*_{adc-7} genes in Monteria, Colombia. *Braz J Microbiol* 2012; 43:1274-1280.
- 16 - Castilho, SRA. Caracterização fenotípica e molecular de *Acinetobacter baumannii* isolados de pacientes de UTIs de Goiânia, com relação à capacidade de formar biofilmes e resistência aos carbapenêmicos. 2013. 97 p. (Master's dissertation). Universidade Federal De Goiás; 2013 Goiânia (GO).

- 17 - Carvalho KR, Cruz JGV, Zahner V. A preliminary molecular epidemiologic study using analysis of variable number of tandem repeats of *Acinetobacter baumannii* OXA-23 producing strains isolated from hospitals in Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev Pan-Amaz Saúde* 2014, 5:57-62.
- 18 - Salimizand H, Noori N, Meshkat Z, Ghazvini K, Amel SJ. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* harboring IS*Aba*1/*bla*_{OXA-23-like} family in a burn center. *Burns* 2015; 41:1100-1106.
- 19 - Bahador A, Raoofian R, Farshadzadeh Z, Beitollahi L, Khaledi A, Rahimi S, et al. The prevalence of IS*Aba*1 and IS*Aba*4 in *Acinetobacter baumannii* species of different international clone lineages among patients with burning in Tehran, Iran. *Jundishapur J Microb* 2015; 8:1-9.
- 20 - Bauer AW; Kirby WMM, Sherris JC. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *J Clin Pathol* 1966; 45:493-496.
- 21 - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. website. <http://www.clsi.org/>. Published 2010.
- 22 - Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1995; 33:11-15.
- 23 - Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Valera FR. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4382-4390.
- 24 - Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27:351-353.
- 25 - Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35:305.

- 26 - Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, Elmor AMR, Lincopan N. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*_{OXA-143} gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:1322-1323.
- 27 - Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of IS*Abal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 258:72-77.
- 28 - Bérézin EB, Towner KJ. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol* 1996; 9:148-165.
- 29 - Brown S, Amyes S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:1-3.
- 30 - Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeghifard N, Aligholi M, et al. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of *bla*_{OXA} genes among *Acinetobacter spp.* isolated from patients at Tehran hospitals. *J Infect Dis* 2008; 61:274-278.
- 31 - Aly M, Tayeb HT, Al Johani SM, Alyamani EJ, Aldughaisheem F. Genetic diversity of *bla*_{OXA-51-like} genes among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Riyadh, Saudi Arabia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33:1223-1228.
- 32 - Levin AS, Mendes CM, Sinto SI, Sader HS, Scarpitta CR, Rodrigues E, et al. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in São Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; 17:366-368.
- 33 - Lee MH, Kuo SC, Chiang MC, Yang SP, Chen CP, Chen TL, et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*_{OXA-23} from hospitals in central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2012; 56:1124-1127.

- 34 - Pinheiro RR, Sabagh BP, Villas BMHS, Neves MC, Pereira DCR, Soares AS. Avaliação da contaminação microbiana em produtos desinfetantes de uso geral. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2013; 72:190-194.
- 35 - Teixeira AB, Martins AF, Barin J, Hermes DM, Pitt CP, Barth AL. First report of carbapenem-resistant *Acinetobacter nosocomialis* isolates harboring IS*Aba1*-*bla*_{OXA-23} genes in Latin America. *J Clin Microbiol* 2013; 51:2739-2741.
- 36 - Chagas TPG, Carvalho KR, Santos ICO, Assef APDC, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79:468-472.
- 37 - Quiñones D, Carvajal I, Perez Y, Hart M, Perez J, Garcia S, et al. High prevalence of *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter spp.* and detection of *bla*_{NDM-1} in *A. soli* in Cuba: report from National Surveillance Program (2010-2012). *New Microbes New Infect* 2015; 7:52-56.
- 38 - Godoy, CSM. Infecções por *Acinetobacter baumannii* em adultos admitidos em unidades de terapia intensiva (UTIs) de Goiânia e Aparecida de Goiânia Goiânia (GO). 2012. 86 p. (Master's dissertation). Universidade Federal de Goiás; 2012. Goiás (GO).
- 39 - Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 16:35-40.
- 40 - Carvalho KR, Assef APDC, Santos LG, Pereira MJF, Asensi MD. Occurrence of *bla*_{OXA-23} gene in imipenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106:505-506.
- 41 - Figueiredo D, Vianna RPT, Nascimento JA. Epidemiologia da infecção hospitalar em uma Unidade de Terapia Intensiva de um hospital público municipal de João Pessoa-PB. *Rev Bras de Ciên Saúde* 2013; 17:233-240.

- 42 - Barin J, Martins AF, Heineck BL, Barth AL, Zavascki AP. Hetero and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; 12:15.
- 43 - Figueiredo S, Poirel L, Croize J, Recule C, Nordmann P. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to IS*Aba1*-mediated overexpression of the natural *bla*_{OXA-66} oxacillinase gene. *Antimicrob. Agents Chemother* 2009; 53:2657-2659.
- 44 - Ruiz M, Marti S, Fernandez F, Pascual A, Vila J. Prevalence of IS*Aba1* in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 274:63-66.
- 45 - Carvalho MR, Moreira ICC, Neta FLA, Guimarães MSO, Viana VGF, Oliveira FW. Incidência de bactérias multirresistentes em uma unidade de terapia intensiva. *R Interd* 2015; 8:75-85.
- 46 - Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* : From bench to bedside. *World J Clin Cases* 2014; 2:787-814.
- 47 - Viehman JA, Nguyen MH, Doi Y. Treatment options for carbapenems resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Drugs* 2014; 74:1315-1333.
- 48 - Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis* 2010; 51(1):79-84.
- 49 - Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol* 2001; 39:183-190.
- 50 - Falagas ME, Koletsi PK, Bliziots IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* 2006; 55:1619-1629.

51 - Nepomuceno RM, Silva LD. Pesquisa bibliográfica dos sistemas de vigilância em ventilação mecânica: o estado da arte na enfermagem. Rev. Latinoam. Enfermagem 2007; 9:191-199.

52 - Silva, RNP. A Importância do *Acinetobacter baumannii* na infecção adquirida nos cuidados de saúde. 2009. 21 p. (Master's dissertation). Universidade de Porto; 2009 Porto (PT).

Confirmação da Submissão do Artigo à Revista

Dear Miss Kobs:

Your manuscript entitled "*Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*: role of the genetic elements *bla*_{oxa} and IS*Aba*1 in resistance to carbapenem antibiotics in the hospital setting" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

Your manuscript ID is RSBMT-2016-0002.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo> and edit your user information as appropriate. You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

Sincerely,

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine Editorial Office.

6 CONCLUSÃO

- No presente estudo foi avaliada a ocorrência dos elementos genéticos *bla*_{OXA} e *ISAb*₁ em isolados clínicos pertencentes ao ABC e sua associação com a o perfil fenotípico de susceptibilidade aos antibióticos carbapenêmicos durante seis anos, a partir de março de 2009. Nossas principais conclusões obtidas foram:
 - Os genes *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-23-like}, codificantes para oxacilinases, predominaram na maioria dos isolados clínicos avaliados. Os demais subgrupos genéticos pesquisados - *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-24-like} e *bla*_{OXA-143-like} - não foram detectados.
 - A maioria dos isolados portadores de *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-23-like} apresentaram resistência aos antibióticos carbapenêmicos; entretanto, apenas a presença de um dos genes *bla*_{OXA} não foi suficiente para conferir resistência aos carbapenêmicos. Os isolados que apresentaram amplificação exclusiva para *bla*_{OXA-51-like} demonstraram sensibilidade aos mesmos.
 - Foi confirmada a detecção de isolados portadores dos genes *bla*_{OXA-51-like} / *bla*_{OXA-23-like} em diversos setores do ambiente hospitalar, sendo sua permanência observada durante todo o período avaliado.
 - Em quase a totalidade dos isolados que apresentaram *bla*_{OXA-23-like} foi observada a presença da sequência de inserção *ISAb*₁. Não foi observada a presença de *ISAb*₁ à frente do gene *bla*_{OXA-51-like}.
 - Em todos os isolados com a sequência de inserção *ISAb*₁ à frente ao *bla*_{OXA-23-like} observou-se resistência aos carbapenêmicos. Em um único isolado em que a presença de *ISAb*₁ foi encontrada não estando associada aos genes codificantes de oxacilinases foi observado sensibilidade aos carbapenêmicos.

- Foi observado que a maioria dos isolados correspondentes ao período entre 2009 e 2015, distribuídos em todos os setores do hospital, apresentaram positividade para IS*Aba1* localizada à frente ao *bla*_{OXA-23-like}.
- Em todos os isolados com a sequência de inserção IS*Aba1* à frente ao *bla*_{OXA-23-like} observou-se resistência aos carbapenêmicos, sugerindo que este seja o principal mecanismo de resistência a estes antibióticos no ambiente investigado.
- A posição da IS no genoma bacteriano parece estar diretamente relacionada ao perfil fenotípico, demonstrando uma forte associação com o perfil de susceptibilidade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

AL JOHANI, S.M.; AKHTER, J.; BALKHY, H. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolates in an adult intensive care unit at a tertiary care center in Saudi Arabia. **Annals of Saudi Medicine**, v. 30, n. 5, p. 364-369, 2010.

ANTONIO, C.S.; NEVES, P.R.; MEDEIROS, M.; MAMIZUKA, E.M.; ELMOR, A.M.R.; LINCOPAN, N. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*_{OXA-143} gene in brazilian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 1322-1323, 2011.

BAHADOR, A.; RAOOFIAN, R.; FARSHADZADEH, Z.; et al. The Prevalence of ISAb_a1 and ISAb_a4 in *Acinetobacter baumannii* species of Different International Clone Lineages Among Patients With Burning in Tehran, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1-9, 2015.

BARATTO, C.M.; MEGIOLARO, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA de bactérias para utilização em RAPD-PCR. *Unoesc & Ciência – ACET*, v. 3, n. 1, p. 121-130, 2012.

BARIN, J.; MARTINS, A.F.; HEINECK, B.L.; BARTH, A.L.; ZAVASCKI, A.P. Hetero and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, p. 15, 2013.

BARROS, L.M.; BENTO, J.N.C.; CAETANO, J.A. et al. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 429-435, 2012.

BARTUAL, S.G.; SEIFERT, H.; HIPPLER, C. et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4382-4390, 2005.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BOGAERTS, P.; NAAS, T.; WYBO, I. et al. Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4189-4192, 2006.

BOUCHER, H.W.; TALBOT, G.H.; BRADLEY, J.S. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009.

BOU, G.; MARTÍNEZ-BELTRÁN, J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an *AmpC* beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 428-32, 2000.

BOUVET, P.J.M.; GRIMONT, P.A.D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 228–240, 1986.

BROWN, S.; AMYES, S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 1-3, 2006.

BROWN, S.; AMYES, S.G.; LIVERMORE, D.M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 4, p.351-353, 2006.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-76, 2010.

CARVALHO, K.R.; CRUZ, J.G.V.; ZAHNER, V. A preliminary molecular epidemiologic study using analysis of variable number of tandem repeats of *Acinetobacter baumannii* OXA-23 producing strains isolated from hospitals in Rio de Janeiro State, Brazil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 5, p. 57-62, 2014.

CARVALHO, K.R.; CARVALHO-ASSEF, A.P.; SANTOS, L.G. et al. Occurrence of *bla*_{OXA-23} gene in imipenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 505-506, 2011.

CARVALHO, K.R.; CARVALHO-ASSEF, A.P.; PEIRANO, G. et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 1, p. 25-28, 2009.

CHEN, T.; LEE, Y.; KUO, S. et al. Emergence and distribution of plasmids bearing the *bla*_{OXA-51-like} gene with an upstream ISAb₁ in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4575–4581, 2010.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty- **Third** Informational Supplement. CLSI document M100S-19. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2009.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100S-20.** Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2010.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100S-21.** Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2011.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100S-22.** Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2012.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100S-23.** Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2013.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100S-24.** Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2014.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100S-25.** Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2015.

DAL-BÓ, K.; SILVA, R.M.; SAKAE, T.M. Infecção hospitalar em uma unidade de terapia intensiva neonatal do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, n. 4, p. 381-385, 2012.

DALLA-COSTA, L.M.; LIBERA, M.; DALLA-COSTA, J. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3403-6, 2003.

DANES, C.; NAVIA, M.N.; RUIZ, J. et al. Distribution of beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (*AmpC* inhibitor) on the MICs of different betalactam antibiotics. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 261-264, 2002.

DERELI, N.; OZAYAR, E.; DEGERLI, S. et al. Três anos de avaliação das taxas de infecção nosocomial em UTI. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 63, n. 1, p. 73-84, 2013.

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

DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAGATOLLA, C. et al. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by 43 restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1108-1113, 1995.

EL-AGEERY, S.M.; ABO-SHADI, M.A.; ALGHAITHY, A.A. et al. Epidemiological investigation of nosocomial infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 16, n. 13, p. 1834-1839, 2012.

ESCOBAR, P.J.A.; OLARTE, E.N.M.; CASTRO-CARDOZO, B.; VALDERRAMA, M.I.A.; GARZÓN A.M.I.; MARTINEZ, N.; et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumonia* in a neonatal unit in Colombia. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 57, p. 1957-1960, 2013.

FEITOSA, M.S.; ZANDONADI, F.N.; ALMEIDA, C.N. et al. *Acinetobacter baumannii*: resistência a antimicrobianos utilizados em uma Unidade de Terapia Intensiva, In: XI; **ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO**, Paraíba. Universidade do Vale do Paraíba, 2012.

FERREIRA, N.L.V.; NOLASCO, M.L.; ESPÍNDULA, B.M. Principais infecções hospitalares que se desenvolvem nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e quais os procedimentos básicos para evitar sua proliferação – Revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 1, n. 1, p. 1-13. 2010. Disponível em: <<http://www.ceen.com.br/revistaeletronica>>. Acesso em 06 jun. 2014.

FIGUEIREDO, D.A.; VIANNA, R.P.T.; NASCIMENTO, J.A. Epidemiologia da infecção hospitalar em uma Unidade de Terapia Intensiva de um hospital público

municipal de João Pessoa-PB. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 17, n. 3, p. 233-240, 2013.

FIGUEIREDO, D.Q.; SANTOS, K.R.; PEREIRA, E.M. et al. First report of the *bla*_{OXA-58} gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 368-370, 2011.

FIGUEIREDO, S.; POIREL, L.; CROIZE, J.; et al. In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to ISAba1-mediated overexpression of the natural *bla*_{OXA-66} oxacillinase gene. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2657-2659, 2009.

FREIRE, I.L.S.; MENEZES, L.C.C.; SOUSA, N.M.L. et al. Epidemiologia das infecções relacionadas à assistência à saúde em Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 11, n. 35, p. 9-15, 2013.

GALES, A.C.; TOGNIM, M.C.; REIS, A.O. et al. Emergence of an *IMP*-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, n. 1, p. 77-79, 2003.

GARCIA, M.L.; CÉSAR, I.C.O.; BRAGA, C.A. et al. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogarresistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 2, p. 45-49, 2013.

GOOTZ, T.D.; MARRA, A. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 6, n. 3, p. 309-325, 2008.

HÉRITIER, C.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n. 2, p. 123-130, 2006.

HIDRI, N. Identification d' *Acinetobacter* spp.au laboratoire. **Reveu francophone des laboratories**, v. Avril, n. 441, p. 37-42, 2012.

HIGGINS, P.G.; LEHMANN, L.; SEIFERT, H. et al. The OXA-143, a novel carbapenem hydrolyzing class D betalactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 5035–5038, 2009.

HIGGINS, P.G.; PÉREZ-LLARENA, F.J.; ZANDER, E. et al. The OXA-235, a novel Class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2121-2126, 2013.

HIGGINS, P.G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antibicrobial Agents**, v. 35, n. 3, p. 305, 2010.

KAMBLE, R. *Acinetobacter* species in health care setting: clinical significance and antimicrobial sensitivity. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 4, p. 861-869, 2015.

KATTAN, J.N.; VELLEGGAS, M.V.; QUINN, V.P. New developments in carbapenems. **Clinical Microbiology and Infection Disease**, v. 14, p. 1102-1111, 2008.

KUO, S.C.; TZULEE, Y.; LINGYANGLAUDERDALE, T. et al. Contribution of *Acinetobacter* derived cephalosporinase to sulbactam resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-9, 2015.

KUSRADZE, I.A.; DIENE, S.M.; GODERDZISHVILI, M. et al. Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 2, p. 164–168, 2011.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S.R.; FUENTEFRIA, D.P. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, p. 430-434, 2010.

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

LIMA, M.E.; ANDRADE, D.; HAAS, V.J. Avaliação prospectiva da ocorrência de infecção em pacientes críticos de Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 3, p. 342-347, 2007.

LIN, A.L.; NONEJUIE, B.P.; MUNGUIA, A.J. et al. Azithromycin synergizes with cationic antimicrobial peptides to exert bactericidal and therapeutic activity against

highly multidrug-resistant gram-negative bacterial pathogens. **EBioMedicine**, v. 2, p. 690-698, 2015.

LEO, L.A.; NONEJUIE, P.; MUNGUIA, J. Azithromycin synergizes with cationic antimicrobial peptides to exert bactericidal and therapeutic activity against highly multidrug-resistant gram-negative bacterial pathogens. **EBioMedicine**, v. 2, p. 690-698, 2015.

LIVERMORE, D.M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 557-584, 1995.

_____ Defining an extended-spectrum beta-lactamase. **Clinical microbiology and infection**, v. 14, p. 3-10, 2008.

_____ Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 247-250, 2001.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Carbapenemases: a problem in waiting? **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 489-495, 2000.

MAHILLON, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 725-774, 1998.

MARTINEZ, P.; MATTAR, S. Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAb_a1-*bla*_{OXA-23,51} and ISAb_a1-*bla*_{adc-7} genes in Monteria, Colombia. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1274-1280, 2012.

MARTINS, P.; COUTO, R.C.; PEDROSO, E.R.P.; SERUFO, J.C. Epidemiologia das infecções hospitalares em Centro de Terapia Intensiva de adulto. **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2006.

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 Programs. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. 55-59, 2009.

Brasília (DF). **MINISTÉRIO DA SAÚDE** (BR). Expede na forma de anexos diretriz e normas para a prevenção e controle das IRAS: Portaria N° 2.616, de 12 de maio de 1998. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, Brasília (DF), 1998.

MOURA, M.E.B.; CAMPELO, S.M.A.; BRITO, F.C.P. et al. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 4, p. 416-421, 2007.

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

NEMEC, A.; KRIZOVA, L.; MAIXNEROVA, M.; VAN DER REIJDEN, T.J.; DESCHAGHT, P.; PASSET, V.; et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 393-404, 2011.

NOBREGA, M.S.; FILHO, J.R.C.; PEREIRA, M.S. Evolução da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em unidades de terapia intensiva. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.15, n.3, p. 696-703, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5216/ree.v15i3.22031>>. Acesso em 01 jun. 2014.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 321-31, 2002.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1791-1798, 2011.

NOWAK, P.; PALUCHOWSKA, P.; BUDAK, A. Distribution of *bla*_{OXA} genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. **The New Microbiologica**, v. 35, n. 3, p. 317-325, 2012.

OLIVEIRA, A.C.; KOVNER, C.T.; SILVA, R.S. Infecção hospitalar em Unidade de Tratamento Intensivo de um Hospital Universitário Brasileiro. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 18, n. 2, p. 97-104, 2010.

OPAZO, A.; DOMÍNGUEZ, M.; BELLO, H. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 6, n. 4, p. 311-316, 2012.

PAGANO, M.; MARTINS, A.F.; MACHADO, A.B.M.P.; BARIN, J.; BARTH, A.L. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAb₁ upstream *bla*_{OXA-51-like} gene in Porto Alegre, southern Brazil. **Epidemiology & Infection**, v. 141, p. 1-4, 2012.

PASTERAN, F.; ALBORNOZ, E.; FACCONI, D.; GOMEZ, S.; VALENZUELA, C.; MORALES, M.; et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 67, p. 1795-1797, 2012.

PATON, R.; MILES, R.S.; HOOD, J. et al. Beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 2, n. 2, p. 81-87, 1993.

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

PEREIRA, M.S.; SOUZA, A.C.S.; TIPPLE, A.F.V. et al. A infecção hospitalar e suas implicações para o cuidar da enfermagem. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 14, n. 2, p. 250-257, 2005.

PILLONETTO, M.; AREND, L.; VESPERO, E.C.; PELISSON, M.; CHAGAS, T.P.G.; ASSEF, A.P.D.C.; et al. First Report of NDM-1-Producing *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 25 in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7592-7594, 2014.

POIREL, L.; LAGRUTTA, E.; TAYLOR, P. et al. Emergence of metallo-beta-lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4914-4916, 2010.

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

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

RAO, R.S.; KARTHIKA, R.U.; SINGH, S.P. et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 333 - 337, 2008.

RUIZ, M.; MARTI, S.; FERNANDEZ-CUENCA, F. et al. Prevalence of ISAba1 in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, n. 1, p. 63-66, 2007.

SACHA, P.; WIECZOREK, P.; HAUSCHILD, T. et al. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* - a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 46, n. 2, p. 137-42, 2008.

SEGAL, H.; GARNY, S.; ELISHA, B.G. Is ISAb_a-1 customized for *Acinetobacter*? **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 2, p. 425-429, 2005.

SEIFERT, H.; DIJKSHOORN, L.; GERNER-SMIDT, P. et al. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2819-2825, 1997.

TEIXEIRA, A.B.; MARTINS, A.F.; BARIN, J.; HERMES, D.M.; PITT, C.P.; BARTH, A.L. First report of carbapenem-resistant *Acinetobacter nosocomialis* isolates harboring ISAb_a1-blaOXA-23 genes in Latin America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 2739-2741, 2013.

TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673-679, 2002.

TOGNIM, M.C.; GALES, A.C.; PENTEADO, A.P. et al. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 7, p. 742-7, 2006.

TOGNIM, M.C.; ANDRADE, S.S.; SILBERT, S. et al. Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 284-291, 2004.

TURTON, J.F.; WOODFORD, N.; GLOVER, J. et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2974-2976, 2006.

VANEECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L.; TJERNBERG, I. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 11-15, 1995.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 373-383, 2006.

WENZEL, R. P. The Lowbury Lecture. The economics of nosocomial infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 31, n. 2, p. 79-87, 1995.

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M.J.; COELHO, J.M. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 4, p. 351-353, 2006.

YONG, D.; TOLEMAN, M.A.; GISKE, C.G.; CHO, H.S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 5046-5054, 2009.

ZANDER, E.; BONNIN, R. A.; SEIFERT, H.; HIGGINS, P.G. Characterization of *bla*_{OXA-143} variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2704-2708, 2014.

AUTORIZAÇÃO

Nome da autora: Vanessa Cristine Kobs

RG: 4.425.548

Título da Dissertação: *Acinetobacter Calcoaceticus* - *Acinetobacter Baumannii*: Papel dos Elementos Genéticos *blaOXA* e *ISAba1* na Resistência aos Antibióticos Carbapenêmicos no Ambiente Hospitalar

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 21 de março de 2016.



Vanessa Cristine Kobs