



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BÁRBARA GIONCO

**ESTUDO DA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E
OCORRÊNCIA DA PRODUÇÃO DE CARBAPENEMASES EM
Acinetobacter baumannii ISOLADOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA**

Londrina
2012

BÁRBARA GIONCO

**ESTUDO DA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E
OCORRÊNCIA DA PRODUÇÃO DE CARBAPENEMASES EM
Acinetobacter baumannii ISOLADOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dr^a. Jacinta Sanches Pelayo.

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G496e Gionco, Bárbara.
Estudo da epidemiologia molecular e ocorrência da produção de carbapenemases em *Acinetobacter baumannii* isolados no Hospital Universitário de Londrina / Bárbara Gionco. – Londrina, 2012.
76 f. : il.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.
Coorientador: Floristher Elaine Carrara-Marroni.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Acinetobacter – Teses. 2. Bactérias gram-negativas – Teses. 3. Antibióticos beta-lactâmicos – Teses. 4. Drogas – Resistência em microorganismos – Teses. 5. Infecção hospitalar – Teses. I. Pelayo, Jacinta Sanchez. II. Carrara-Marroni, Floristher Elaine. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579.841

BÁRBARA GIONCO

**ESTUDO DA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E OCORRÊNCIA DA
PRODUÇÃO DE CARBAPENEMASES EM *Acinetobacter baumannii*
ISOLADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Jacinta Sanchez
Pelayo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Maria Cristina Bronharo Tognim
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Profa. Dra. Renata Cristina Picão
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Londrina, 08 de março de 2012.

À minha família

Pai, mãe e sis, obrigada pelo apoio, compreensão, carinho e eterno amor que nada cobra, por estarem ao meu lado me trazendo coragem nos momentos em que desanimei e duvidei que daria certo! Vocês são tudo que tenho. Obrigada, essa conquista eu também devo a vocês!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Santíssima Trindade, ao meu Deus que é Pai, Filho e Espírito Santo. Todo mérito dessa conquista é Vosso, pois é pelo Vosso amor que tive força e coragem para chegar até aqui. Obrigada por me mostrarem sempre o caminho.

A minha mãe do céu, Maria Santíssima, pela sua intercessão Imaculada, pelas inúmeras vezes que chorei aos vossos pés e por sempre me levar a Jesus. Obrigada mãe! Que eu possa ser metade da mulher que você é!

A minha orientadora Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo pela oportunidade. Graças a sua orientação eu pude realizar o sonho de fazer um mestrado, serei eternamente grata.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Floristher Elaine Carrara Marroni. Flor, obrigada por esses anos de convivência e aprendizado, tenho certeza que sou uma pessoa mais madura hoje graças a tudo que passamos juntas. Muito obrigada por não medir esforços para me ajudar e por sempre se preocupar comigo.

A Profa. Dra. Marcia Regina Eches Perugini. Muito obrigada Marcia por todas as oportunidades que você me proporcionou, pelos momentos descontraídos ao seu lado por toda ajuda e disponibilidade.

A Profa. Dra. Maria Cristinha Bronharo Tognim. Cris, muito obrigada por toda a ajuda e direcionamento. Você, mesmo à distância, se fez presente para que meu trabalho desse certo.

Ao Prof. Dr. Emerson José Venancio. Emerson, muito obrigada por toda

a ajuda e paciência, por me ouvir e sempre ter uma palavra de conforto!

A Profa. Dra. Renata Cristina Picão pela ajuda enquanto estive em São Paulo e pela disponibilidade em participar da banca.

A Profa. Dra. Ana Cristina Gales, Dr. Rodrigo Cayô e a todos do Laboratório ALERTA - UNIFESP. Muito obrigada pela ajuda e apoio. Os momentos que passei em São Paulo com vocês me fizeram amadurecer muito e ter uma visão ampliada da vida.

Ao Prof. Dr. Laurival Vilas Boas, a Profa. Dra. Gislayne Vilas Boas e aos alunos do Laboratório de Bioinseticida. Obrigada por sempre abrirem as portas para mim!

As minhas queridas companheiras do Laboratório de Microbiologia Clínica do Ambulatório do Hospital das Clínicas, Priscila Nomura, Natália Silva, Michele Montini, Priscila Romanin e Raquel Palermo. Obrigada pela companhia de todos os dias, pelas risadas, por me ouvirem chorar, pelo apoio. Agradeço de coração por toda a ajuda com meus experimentos! Em especial quero agradecer a você Pri, que sem medir esforços sempre esteve do meu lado.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia IV. Em especial a Amanda, Narciso, Fábio e Sandy. Com vocês junto foi mais fácil e divertido continuar, é muito bom ter vocês em minha vida!

Ao meu amado amigo Eliandro Reis Tavares. Elizandro, você é bem mais que um amigo, é um irmão de alma! Obrigada por ser meu companheiro durante esses anos e por trazer alegria aos meus dias! A minha vida é bem melhor por você existir!

A amiga conquistada durante esses anos de mestrado Ana Carolina Polano

Vivan. Carol, obrigada por dividir as tristezas e somar alegrias comigo! Pela confiança, amizade e companhia. Agradeço a Deus por ter te conhecido!

A Marina de Souza Bastos e Thatiany Cevallos Menegucci. Obrigada por toda ajuda, vocês sempre me estenderam a mão e me ensinaram muito. Conhecer vocês me fez ver que ainda existem no mundo pessoas de bom coração dispostas a ajudar e que não pensam no que vão receber em troca.

Aos meus amigos Rafaelle e Gabriel. Com certeza vocês são anjos enviados por Deus em minha vida. Obrigada por me ajudarem em todos os momentos, pelo carinho, confiança e amizade. Amo vocês!

A todos vocês do Javé Nessi, minha segunda família. Vocês trazem colorido aos meus dias! Foi junto de vocês que eu tirei forças para continuar. Obrigada a cada um de vocês amados!

Aos queridos do AHC e HU. Rui, Lu, Elda, Ivone, Marilene, Ruth, Lourdes e a tantos outros que compartilharam tantos momentos comigo. Obrigada, pela companhia, pelas conversas agradáveis e pelos momentos de descontração.

Obrigada a todos os professores e alunos do Mestrado em Microbiologia da UEL. Vocês mais do que me ensinaram, abriram meus olhos para uma nova vida.

Enfim, meu muito obrigada a todos que de alguma forma ajudaram, torceram, rezaram e se preocuparam comigo, essa vitória também devo a cada um de vocês!

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e realizado com auxílio técnico científico da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

“Sempre que estiveres para te desviar para um lado ou para outro, poderás ouvir atrás de ti a palavra de Quem te orienta: “O caminho é este, por aqui deves andar!”.”

Isaías 30: 21

GIONCO, Bárbara. **Estudo da epidemiologia molecular e ocorrência da produção de carbapenemases em *Acinetobacter baumannii* isolados no Hospital Universitário de Londrina.** 2012. 76f. (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

A detecção de isolados de *Acinetobacter baumannii* multiresistente aos antimicrobianos é uma crescente realidade nos hospitais brasileiros. Altas taxas de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* são relatadas em importantes centros de saúde, onde a produção de carbapenemases emergiu como o mecanismo predominante de resistência. β -lactamases da classe D capazes de hidrolizar carbapenêmicos (CHDLs) são as carbapenemases mais prevalentes em *Acinetobacter* spp.. Este estudo teve como objetivo avaliar a situação da resistência aos carbapenêmicos e investigar a produção de carbapenemases entre isolados clínicos de *A. baumannii* recuperados no Hospital Universitário de Londrina (HU) no período de agosto de 2006 a junho de 2009. Um total de 91 isolados não repetidos, resistentes ou intermediários aos carbapenêmicos ou ceftazidima (CARB/CAZ-I/R), foram testados. A identificação bacteriana foi feita pela presença no gene *blaOXA-51* (íntrínseco à *A. baumannii*). O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi avaliado pelas técnicas de disco difusão e microdiluição em caldo automatizada. A concentração inibitória mínima (CIM) dos carbapenêmicos, ceftazidima, ampicilina-sulbactam e polimixina B foi determinada pela técnica de agar diluição. Os isolados foram pesquisados para a produção de CHDLs e metalo-beta-lactamases através do Teste de Hodge modificado (THM) e do Teste de Sinergismo de Triplo Disco (TSTD), respectivamente. PCR foi realizada para a detecção de genes codificadores de CHDLs, etalo-beta-lactamases (MBL), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase KPC) e para a sequência de inserção *ISAbal*. A maioria dos isolados foram recuperados de urina (30.7%) e de pacientes internados nas unidades de terapia intensiva (38.9%). Altas taxas de resistência às principais classes de antimicrobianos foram verificadas: 92.3% para ciprofloxacina, 86.6% para amicacina, 63.3% para gentamicina. Entre os beta-lactâmicos: cefotaxima 92.3%, ceftazidima 95.6% e carbapenêmicos: 80.2% para o imipenem e meropenem. Apenas 15.3% das cepas apresentaram sensibilidade a ampicilina-sulbactam. Os antimicrobianos que apresentaram maior atividade foram a polimixina B e tigeciclina, 95.6% e 100% de sensibilidade, respectivamente. Os genes codificadores das CHDLs foram detectados em 62.2% dos isolados testados e em nenhum isolado foram detectados genes codificadores de MBL e KPC. O gene *blaOXA-23-like* foi detectado em 61.2% dos isolados e em 98.2% *ISAbal* estava localizada a montante do gene. O gene *blaOXA-143* foi detectado em um isolado. Além disso, um isolado sensível aos carbapenêmicos e portador do gene *blaOXA-23-like* foi detectado evidenciando a ameaça da disseminação silenciosa deste gene de resistência no ambiente hospitalar. Os dados obtidos ressaltam a alta prevalência de isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos e portadores de *blaOXA-23-like* no HU de Londrina evidenciando a importância destes determinantes de resistência como reponsáveis pela manutenção de um estado endêmico deste patógeno em nosso hospital.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*. Multiresistência. Carbapenemases.

GIONCO, Bárbara. **Study of molecular epidemiology and occurrence of the production of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* isolates at Hospital Universitário de Londrina.** 2012. 76f. Dissertation (M.Sc. Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

The detection of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* to antibiotics is an increasing reality in different Brazilian hospitals. High rates of carbapenem resistance in *A. baumannii* are reported in relevant health centers in the world, where production of carbapenemases has emerged as the predominant mechanism of resistance to these antimicrobials. The Carbapenem hydrolysing class D β -lactamases (CHDL) are the most prevalent carbapenemases in *Acinetobacter* spp. This study aims to evaluate the situation of carbapenem resistance and to investigate the production of carbapenemases among clinical isolates of *A. baumannii* recovered at the Hospital Universitário de Londrina (HU) from August 2006 to June 2009. A total of 91 non-duplicate, resistant or intermediate to carbapenems or ceftazidime (CARB/CAZ-I/R) were tested. The bacterial identification was performed by the presence of *bla*OXA-51 gene (intrinsic to *A. baumannii*). The profile of antimicrobial susceptibility was evaluated by disk diffusion and automated broth microdilution. The minimum inhibitory concentration (MIC) to carbapenems (imipenem and meropenem), ceftazidime, ampicillin-sulbactam and polymyxin B was determined by dilution agar method. The isolates were screened for the production of CHDL and metallo-beta-lactamases (MBL) by modified Hodge test (HT) and Synergism Triple Disk Test (TSTD), respectively. PCR was performed for detection of genes encoding CHDLs, MBL, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and for *SAb1* insertion sequence I. The most of isolates were recovered from urine (30.7%) and patients hospitalized in intensive care units (38.9%). High resistance rates of resistance to major classes of antimicrobials were observed among isolates CARB/CAZ-I/R: 92.3% for ciprofloxacin, 86.6% for amikacin, 63.3% for gentamicin. Among the beta-lactams, cefotaxime 92.3%, ceftazidime 95.6% and carbapenems: 80.2% for imipenem and meropenem. Only 15.3% strains were susceptible to ampicillin-sulbactam. The antibiotics that showed the highest activity against the strains studied were the polymyxin B (95.6% sensibility) and tigecycline (100% sensibility). The genes encoding CHDLs were detected in 62.2% isolates tested and none gene encoding MBL and KPC were detected. The *bla*OXA-23-like gene was detected in 61.2% of isolates and the *ISAb1* sequence was located upstream of these genes in 98.2% of isolates. The *bla*OXA-143 gene was detected in only one isolated. An isolate sensitive to carbapenems and carrying the *bla*OXA-23-like gene was detected, indicating the threat of the silent spread these resistance genes in our hospital. This study emphasize the high prevalence of clinical isolates of *A. baumannii* resistant to carbapenems carrying *bla*OXA-23-like gene in HU, evidencing the importance of these resistance determinants as responsible for the high resistance rates to these drugs and maintaining an endemic state of this pathogen in our hospital.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*. Multidrug resistance. Carbapenemases.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	11
INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	18
Objetivo Principal	18
Objetivos Específicos	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
ARTIGO I - Panorama atual de carbapenemases em <i>Acinetobacter baumannii</i>	22
ARTIGO II - Emergence of <i>bla</i> _{OXA-143} gene and dissemination of OXA-23-producing carbapenem non-susceptible <i>Acinetobacter baumannii</i> in a teaching hospital in Southern Brazil	53
ARTIGO III - Detection of OXA-231, a new variant of <i>bla</i> _{OXA-143} , in <i>Acinetobacter baumannii</i> from Brazil: a case report	69
CONCLUSÕES	76

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado foi redigida sob a forma de artigos científicos. Apresentamos a seguir três artigos: (i) uma revisão bibliográfica sobre o panorama atual de carbapenemases em *Acinetobacter baumannii*, (ii) um artigo que relata a multiresistência e a frequência da produção de carbapenemases entre isolados de *A. baumannii* no complexo Hospital Universitário/ Ambulatório do Hospital das Clínicas (HU/AHC) de Londrina e (iii) uma *brief report* sobre a detecção de uma nova variante enzimática do gene *bla*_{OXA-143} denominada *bla*_{OXA-231} no HU. O último trabalho foi realizado em parceria ao laboratório ALERTA da Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo, dirigido pela Prof. Dr. Ana Cristina Gales.

A realização deste trabalho contou com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos foram considerados “drogas milagrosas” logo após a sua introdução e utilização clínica a partir da década de 40. Pacientes com pneumonia pneumocócica foram curados e infecções bacterianas como sífilis e tuberculose foram eficientemente controladas com penicilina G e estreptomicina, respectivamente. As cirurgias de grande porte tornaram-se procedimentos mais seguros e os pacientes submetidos à quimioterapia foram protegidos durante os períodos de neutropenia (Lee et al., 2011). No entanto, à medida que estes fármacos eram utilizados, detectava-se, paralelamente, a resistência bacteriana aos mesmos. Hoje, sabe-se que a emergência da resistência é uma consequência inevitável da utilização dos antimicrobianos, já que novos mecanismos de resistência são detectados logo após a introdução de novos antimicrobianos na prática clínica (Burgess, Rapp, 2008).

A resistência aos antimicrobianos, especialmente entre os bacilos Gram-negativos (BGN), tornou-se um sério problema de saúde pública mundial. As infecções hospitalares causadas por BGN multiresistentes (BGN-MR) constituem uma epidemia global, principalmente entre os pacientes internados nas unidades de terapia intensiva (UTIs), e incluem predominantemente: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes e enterobactérias resistentes às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenêmicos (Martínez-Martínez, Calvo, 2010; Kollef et al., 2011). A persistência e a disseminação dos BGN-MR no ambiente hospitalar deve-se, em grande parte, à capacidade destes microrganismos em desenvolver e acumular mecanismos de resistência efetivos. No entanto, a escassez na produção de novos antimicrobianos dirigidos contra estes patógenos e o uso indiscriminado dos antimicrobianos de amplo espectro já existentes são fatores coadjuvantes que contribuem para agravar esta situação (Kunz, Brook, 2010).

Embora tenha sido considerado um microrganismo oportunista e de baixa patogenicidade na década de 60 e muitas vezes ignorado quando isolado de amostras clínicas, *A. baumannii* tornou-se um dos mais importantes patógenos da atualidade. Além do seu papel como agente causador de infecções hospitalares graves e de difícil tratamento, este microrganismo está

associado a importantes infecções adquiridas na comunidade (Peleg, Seifert, Paterson, 2008).

As infecções hospitalares causadas por *A. baumannii* incluem predominantemente pneumonia associada à ventilação mecânica seguida por infecções urinárias, infecções sanguíneas, infecções de feridas e meningites. A maioria das infecções comunitárias relatadas são pneumonias agudas em pacientes com fatores de risco como alcoolismo crônico ou doenças broncopulmonares que geralmente evoluem para choque séptico, que levam a altas e taxas de mortalidade (40-60%). Recentemente *A. baumannii* tem sido descrito como um importante patógeno responsável por infecções de feridas tecidos moles, relacionadas a situações emergenciais e incomuns, como aquelas causadas nas vítimas de terremotos ou em soldados militares das guerras do Iraque e do Afeganistão (Scott et al., 2007; Oncul et al., 2002). De acordo com os dados do *National Healthcare Safety Network* (NHSN), entre os anos de 2006 e 2007, *A. baumannii* ocupou o nono lugar entre os principais patógenos associados a infecções relacionadas à saúde e o terceiro lugar entre os principais microrganismos causadores de pneumonia associada à ventilação mecânica, sendo precedido somente por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Hidron et al., 2008).

O sucesso de *A. baumannii* como patógeno hospitalar está amplamente relacionado à capacidade deste microrganismo sobreviver por períodos prolongados nesse ambiente potencializando assim sua habilidade em produzir desde surtos de infecções circunscritos (associados a um reservatório ambiental específico), até complexas situações de endemia com múltiplos reservatórios envolvidos (pacientes colonizados, superfícies inanimadas e reservatórios úmidos ou sob dessecação) (Peleg, Seifert, Paterson, 2008). Além disso, a resistência intrínseca que este microrganismo apresenta frente a diferentes classes de antimicrobianos somada à sua notável habilidade em adquirir e acumular elementos genéticos móveis com determinantes de resistência adicionais, leva a emergência de isolados clínicos multirresistentes, principalmente aos β -lactâmicos de amplo espectro, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (Zarrilli et al., 2009).

Existem diferentes definições relacionadas à resistência utilizadas na literatura médica. Recentemente um grupo de peritos internacionais reuniu-se através de uma iniciativa conjunta do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (*European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC*) e dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention – CDC*) para criar um padrão internacional de terminologia nessas definições para as principais bactérias responsáveis por infecções hospitalares. De acordo com essa nova terminologia, em *Acinetobacter spp.*, o termo multiresistência (*multidrug-resistant – MR*) deve ser atribuído às bactérias não suscetíveis a pelo menos um agente, em três ou mais classes, dos antimicrobianos testados contra esse patógeno. A denominação extensivamente resistente (*extensively drug-resistant – XDR*) deve ser utilizada quando o isolado não for suscetível a pelo menos um agente antimicrobiano entre todas as classes testadas contra *Acinetobacter spp.* com exceção de duas ou menos classes. Por fim a definição pan-resistente (*pandrug-resistant – PDR*) engloba as bactérias do gênero *Acinetobacter* que não são suscetíveis a todos os agentes antimicrobianos em todas as classes testadas (Magiorakos et al., 2012).

Geralmente a MR em *A. baumannii* está relacionada à aquisição de ilhas de resistência devido à eficiente plasticidade genômica que este microrganismo apresenta, principalmente quando se encontra sob pressão seletiva de antimicrobianos. A análise do seqüenciamento de isolados clínicos de *A. baumannii* MR demonstrou a presença de ilhas de resistência contendo alta concentração de genes associados à resistência aos antimicrobianos, metais pesados e anti-sépticos e intercalados por uma diversidade de sequências relacionadas à integrons-transposons que, possivelmente, facilitaram a transferência dos mesmos a partir de fontes ambientais (Fourinier et al., 2006; Nigro, Hall, 2011; Post, With, Hall, 2010).

Os aminoglicosídeos, os β -lactâmicos e as tetraciclinas foram amplamente utilizados no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* até a década de 70. A introdução dos carbapenêmicos nos anos 80 representou uma excelente opção terapêutica para as infecções causadas por cepas MR, produtoras de β -lactamases de espectro estendido (*Extended*

Spectrum β -lactamase – ESBLs), resistentes aos aminoglicosídeos ou às fluoroquinolonas (Zarrili et al., 2009). No entanto, o uso extensivo destes antimicrobianos no ambiente hospitalar levou ao rápido aparecimento de cepas resistentes a estes fármacos, restringindo drasticamente as opções terapêuticas (Nordmann, Poirel, 2008). Estudos indicam que os isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (ABRC) têm aumentado gradativamente durante os últimos dez anos na Europa, América do Norte e América Latina. Surtos causados por ABRC já foram relatados em países do mundo todo como Espanha, Portugal, Holanda, Grécia, Itália, Turquia, Líbano, Argentina, Brasil, África do Sul, Japão, China, Taiwan, Coreia do Sul e Austrália (Zavascki et al., 2010; Nordmann, 2010). Dados do SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* revelaram que entre os anos de 2006-2009 a resistência global ao imipenem em *Acinetobacter* spp. era de aproximadamente 56% e na América Latina de 48.3% (Gales, Jones, Sader, 2011). Segundo Rossi (2011), a taxa média de resistência aos carbapenêmicos em amostras de *A. baumannii* isolados no Brasil varia entre 25% e 45%. Para os isolados de ABRC as opções terapêuticas ficam restritas às polimixinas (polimixina B e colistina) e à tigeciclina. No entanto, amostras resistentes a estes antimicrobianos tem sido detectados e estão relacionados à terapia prévia com estes fármacos (Zavascki et al., 2010; Rossi, 2011).

A resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* pode ser mediada por diversos mecanismos, incluindo inibição enzimática do antimicrobiano por carbapenemases codificadas por genes plasmidiais ou cromossômicos, hiperprodução de sistemas de efluxo e modificações ou perdas de proteínas de membrana externa (porinas). A associação destes mecanismos de resistência em uma mesma cepa pode modular a concentração inibitória mínima (CIM) aos carbapenêmicos originando altos níveis de resistência a estes antimicrobianos (Durante-Mangoni, Zarrilli, 2011).

A produção de carbapenemases constitui o mais preocupante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*, uma vez que os genes codificadores destas enzimas encontram-se geralmente localizados em plasmídeos ou transposons que podem ser transferidos rapidamente entre bactérias. As enzimas pertencentes à classe D de Ambler (conhecidas por

CHDLs - *Carbapenem hydrolysing class D β -lactamases* - ou OXA-carbapenemases) são as principais carbapenemases detectadas em bactérias do gênero *Acinetobacter*. Entretanto as metalo-beta-lactamases (MBL), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e Guiana-Extended-Spectrum carbapenemase (GES-carbapenemases) também foram identificadas (Poirel, Naas, Nordmann, 2010; Moubareck et al., 2009).

A detecção adequada dos isolados de ABRC produtores de carbapenemases é importante para a adequação da antibioticoterapia empírica e para o estabelecimento das medidas de controle de infecção dentro de uma instituição. Os métodos fenotípicos podem ser realizados nos laboratórios de rotina microbiológica, mas até o momento, não foram recomendados pelo *Clinical Laboratory and Standard Institute* (CLSI) para a detecção de carbapenemases em isolados de *A. baumannii*. O Teste de Hodge modificado e os testes de disco-aproximação que utilizam o ácido etileno diamino tetracético (EDTA) ou ácido mercaptopropiônico como inibidores têm sido utilizados na detecção de carbapenemases e MBLs em *A. baumannii*, respectivamente. O Etest-MBL contendo imipenem com ou sem EDTA é frequentemente utilizado na detecção de MBL, mas pode originar resultados duvidosos, falsos positivos e negativos. Embora as OXA-carbapenemases sejam susceptíveis à inibição por NaCl a inibição, *in vitro*, destas enzimas podem não ser detectada em todas as ocasiões em que se utiliza esta substância como inibidor e a oxacilina como substrato. Os métodos moleculares baseados na técnica de *Polimerase Chain Reaction* (PCR) seguida por sequenciamento constituem as técnicas padrão-ouro de detecção destas enzimas. No entanto estas técnicas são preferencialmente utilizadas nos laboratórios de referência ou de pesquisa, uma vez que requerem técnicos treinados e equipamentos especiais (Navarro et al., 2011).

Em abril de 2003 foi detectado no Hospital Universitário de Londrina (HU) um isolado de ABRC recuperado da secreção traqueal de um paciente com broncopneumonia. Em maio do mesmo ano foram detectados quatro novos isolados clínicos, três de secreções traqueais e um proveniente de swab retal. A Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) iniciou, então, um programa de prevenção e controle deste microrganismo. No entanto, a taxa de

resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* cresceu drasticamente e esse patógeno passou a ser considerado endêmico no HU (Carneiro, 2007).

Um estudo comparativo realizado por Viana e colaboradores (2011) analisou a evolução da resistência aos antimicrobianos em *A. baumannii* no HU. Esse estudo revelou que o primeiro caso de ABRC nesse hospital ocorreu em 1994, antes do surto relatado em 2003 por Carneiro (2007). Entre 1994-1996 a taxa de resistência aos carbapenêmicos nessa espécie era de 2%, dez anos depois, entre 2004-2007, houve um aumento significativo da taxa para 73%. Entre os anos de 2007 e 2008 a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* era de aproximadamente 30%. Além disso, nesse período 66,7% das cepas resistentes eram produtoras de carbapenemases do tipo OXA, codificadas por genes inseridos em elementos genéticos móveis (GIONCO et al., 2008).

As altas taxas de resistência aos carbapenêmicos e a detecção de carbapenemases evidenciam o problema vivenciado no HU em relação à terapêutica das infecções por *A. baumannii*. A detecção de carbapenemases entre os isolados motivou o presente estudo. Conhecer a frequência de ocorrência dos isolados clínicos de ABRC, verificar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e a incidência dos genes mediadores de resistência, bem como seu contexto genético é considerado fundamental para um controle efetivo da disseminação dos isolados de *A. baumannii* multiresistentes no HU.

OBJETIVOS

Objetivo Principal

Detectar as principais carbapenemases entre isolados clínicos de *A. baumannii* recuperados de material biológico de pacientes hospitalizados no HU no período de agosto de 2006 a julho de 2009.

Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos de *A. baumannii* pelas técnicas de disco-difusão e microdiluição em caldo automatizada;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem), ceftazidima, ampicilina-sulbactam, polimixina B e tigeciclina pela técnica de diluição em agar;
- Pesquisar a presença de carbapenemases entre os isolados de *A. baumannii* resistentes ou intermediários aos carbapenêmicos ou ceftazidima (CARB/CAZ-I/R) por meio de testes fenotípicos.
- Pesquisar os genes que codificam as carbapenemases do tipo OXA, MBL e KPC pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e realizar o sequenciamento entre os isolados que apresentarem características genotípicas diferenciadas;
- Estabelecer a relação clonal entre os isolados de *A. baumannii* através de tipagem molecular por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – PCR* (ERIC-PCR).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURGESS, D. S.; RAPP, R. P. Bugs versus drugs: addressing the pharmacist's challenge. **Am. J. Health-Syst. Pharm.**, v.65, Suppl.2, p. S4-S15, 2008.

CARNEIRO, M. *Acinetobacter baumannii* multiresistentes em pneumonia associada à ventilação mecânica. **Dissertação (Obtenção do Título de Mestre em Microbiologia)**, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th informational supplement**. Clinical and Laboratory Standards, Wayne, 2009.

DURANTE-MANGONI, E.; ZARRILLI, R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. **Future Microbiol.**, v. 6, p. 407-422, 2011.

FOURNIER, P. E.; VALLENET, D.; BARBE, V.; AUDIC, S.; OGATA, H.; POIREL, L.; RICHET, H.; ROBERT, C.; MANGENOT, S.; ABERGEL, C.; NORDMANN, P.; WEISSENBAACH, J.; RAOULT, D.; CLAVERIE, J. M. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS Genet.**, v.2, p.e7, 2006.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). **J. Antimicrob. Chemother.** v. 66, p. 2070-2074, 2011.

GIONCO, B.; TOGNIM, M. C. B.; PELAYO, J. S.; PELLEGRINI, A. S.; CARRARA-MARRONI, F. E. *Acinetobacter baumannii* portadores dos genes *bla_{OXA-23}* e *bla_{OXA-51}* isolados no Hospital Universitário de Londrina. **Braz. J. Infect. Dis.** **12 (Suppl 3)**, 2008.

HIDRON, A. I.; EDWARDS, J. R.; PATEL, J.; HORAN, T. C.; SIEVERT, D. M.; POLLOCK, D. A.; FRIDKIN, S. K. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2006-2007. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.** v. 11, p. 996-1011, 2008.

KOLLEF, M. H.; GOLAN, Y.; MICEK, S. T.; SHORR, A. F.; RESTREPO, M. I. Appraising contemporary strategies to combat multidrug resistant Gram-negative bacterial infections-proceedings and data from the Gram-negative resistance summit. **Clin. Infect. Dis.** v. 53, Suppl.2, p. S33-S55, 2011.

KUNZ, A. N.; BROOK, I. Emerging resistant Gram-negative aerobic bacilli in hospital acquired infections. **Chemotherapy**, v.56, p.492-500, 2010.

LEE, K.; DONGEUN, Y.; JEONG, S.H.; CHONG, Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. **Yonsei Med.**, v.52, p. 879-891, 2011.

MAGIAROKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBATH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEGUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.18, p.268-281, 2012.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; CALVO, J. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos Gram-negativos: situación actual. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, v.28(Suppl 2), p.25-31, 2010.

MOUBARECK, C.; BRÉMONT, S.; CONROY, M.C.; COUVARLIN, P.; LAMBERT, T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents. Chemother.** v.53, p.3579-3581, 2009.

NAVARRO, F.; CALVO, J.; CANTÓN, R.; FERNENDEZ-CUENCA, F.; MIRELIS, B. Detección fenotípica de mecanismos de resistência em microorganismos Gram-negativos. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v.29, p.524-534, 2011.

NIGRO, S. J.; POST, V.; HALL, R. M. The multiresistant *Acinetobacter baumannii* European clone I type strain RUH875 (A297) carries a genomic antibiotic resistant island AbaR21, plasmid pRAY and cluster containing *ISAbal-sul2-CR2-strB-strA*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.66, p.1928-30, 2011.

NORDMANN, P. Gram-negative bacteriae with resistance to carbapenems. **Med. Sci (Paris)**, v. 11. P. 950-959, 2010.

NORDMANN, P.; POIREL, L. *Acinetobacter baumannii* – basic and emerging mechanisms of resistance. **Europ. Infec. Dis.**, v. 2, p. 94-97, 2008.

ONCUL, O.; KESKIN, O.; ACAR, H. V.; KUCUKARDALI, Y.; EVRENKAYA, R.; ATASOYU, E. M.; TOP, C.; NALBANT, S.; OZKAN, S.; EMEKDAS, G.; CAVUSLU, S.; US, M. H.; PAHSA, A.; GÖKBEN, M. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. **J. Hosp. Infect.**, v.51, p.47-51, 2002.

PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.21, p.538-582, 2008.

POIREL L.; NAAS, T.; NORDAMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, p. 24-38, 2010.

POST, V.; WHITE, P. A.; HALL, M. Evolution of AbaR-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J. Antimicrobial. Chemother.**, v.65, p.1162-70, 2010.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 9, p. 1138-1143, 2011.

SCOTT, P.; DEYE, G.; SRINIVASAN, A.; MURRAY, C.; MORAN, K.; HULTEN, E.; FISHBAIN, J.; CRAFT, D.; RIDDELL, S.; LINDLER, L.; MANCUSO, J.; MILSTREY, E.; BAUTISTA, C. T.; PATEL, J.; EWELL, A.; HAMILTON, T.; GADDY, C.; TENNEY, M.; CHRISTOPHER, G.; PETERSEN, K.; ENDY, T.; PETRUCCELLI, B. An outbreak of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. **Clin. Infect. Dis.**, v.44, p.1577-84, 2007.

VIANA, G. F.; DOS SANTOS SAALFELD, S. M.; GARCIA, L. B.; CARDOSO, C. L.; PELISSON, M.; TOGNIM, M. C. B. Evolution of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital. **Appl. Microbiol.** v. 53, p. 374-378, 2011.

ZARRILLI R.; GIANNOULI, M.; TOMASONE, F.; TRIASSI, M.; ATHANASSIOS, T. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. **J. Infect. Dev. Ctries**, v. 3, p. 335-341, 2009.

ZAVASCKI, A. P.; CARVALHAES, C. G.; PICAIO, R. C.; GALES, A. C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 8, p. 71–93, 2010.

Artigo I

Panorama atual de carbapenemases em *Acinetobacter baumannii*

Artigo em construção

Este artigo será enviado para o periódico Revista Panamericana de Infectologia em forma de Revisão

Panorama atual de carbapenemases em *Acinetobacter baumannii*

Bárbara Gionco (Gionco, B)

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina
Mestranda em Microbiologia pela Universidade Estadual de Londrina
Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380. CEP 86051-980, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55 43 33715726

Floristher Elaine Carrara-Marroni (Carrara-Marroni, FE)

Graduada em Farmácia com habilitação em Análises Clínicas pela Universidade Estadual de Maringá
Mestre em Microbiologia pela Universidade Estadual de Londrina
Doutora em Microbiologia pela Universidade Estadual de Londrina
Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380. CEP 86051-980, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55 43 33715726

Jacinta Sanchez Pelayo (Pelayo, JS)

Graduada em Ciências Biológicas Modalidade Médica pela Universidade Estadual de Londrina
Mestre em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo
Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380. CEP 86051-980, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55 43 33714494

Realização: Laboratório de Microbiologia do Ambulatório Hospital das Clínicas – Departamento de Microbiologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Autor correspondente: Floristher Elaine Carrara-Marroni. Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380. CEP 86051-980, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55 43 33715726; e-mail: floristher@gmail.com

Panorama atual de carbapenemases em *Acinetobacter baumannii*

Introdução

O gênero *Acinetobacter* (do grego ακινετος - *akinetos* – imóvel) compreende bactérias Gram-negativas cocobacilares, não fermentadoras da glicose, catalase positivas, oxidase negativas e estritamente aeróbias. Atualmente este gênero é constituído por 43 espécies, 26 com nomes válidos publicados (<http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>, último acesso em 23 fevereiro de 2012).^(1,2,3) *Acinetobacter baumannii*, é a espécie mais representativa em eventos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAs) - responsável por 80% dessas infecções.⁽⁴⁾ Isto se deve, em grande parte, à capacidade deste microrganismo sobreviver no ambiente hospitalar, em superfícies inanimadas, sob condições de dessecação e na ausência de nutrientes por períodos prolongados.^(5,6)

A. baumannii pertence ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus* – *A. baumannii* (complexo Acb) constituído pelas espécies *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter* genoespécie 3 e *Acinetobacter* genoespécie 13TU – à essas duas últimas genoespécies foi recentemente proposto a substituição para os nomes formais *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis*, respectivamente⁽⁷⁾, sendo essas espécies classificadas neste grupo somente podem ser diferenciadas por técnicas moleculares.⁽⁸⁾ *A. baumannii* já foi isolado do solo, água, animais e humanos. Curiosamente também foram recuperados de piolhos, e culturas de peixe e camarão (no sudeste da Ásia).^(8,9,10) Recentemente foi demonstrado que essa espécie é capaz de sobreviver e crescer no interior de *Acanthamoeba* sp..⁽¹¹⁾

A resistência aos agentes antimicrobianos pode ser considerada a principal vantagem de sobrevivência de *A. baumannii* nos ambientes hospitalares. *A. baumannii* é intrinsecamente resistente a aminopenicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração e cloranfenicol. Como consequência do uso extensivo de antimicrobianos e da aquisição de genes

codificadores de resistência - principalmente aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina - isolados de *A. baumannii* multiresistentes têm sido cada vez mais reportados na última década.⁽¹²⁾

Existem diferentes definições relacionadas à resistência utilizadas na literatura médica. Recentemente um grupo de peritos internacionais reuniu-se através de uma iniciativa conjunta do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (*European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC*) e dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC*) para criar um padrão internacional de terminologia nas definições de resistência para as principais bactérias responsáveis por infecções hospitalares. De acordo com essa nova terminologia, em *Acinetobacter* spp., o termo multiresistência (*multidrug-resistant - MR*) deve ser atribuído às bactérias não suscetíveis a pelo menos um agente, em três ou mais classes, dos antimicrobianos testados contra esse patógeno. A denominação extensivamente resistente (*extensively drug-resistant - XDR*) deve ser utilizada quando o isolado não for suscetível a pelo menos um agente antimicrobiano entre todas as classes testadas contra *Acinetobacter* spp. com exceção de duas ou menos classes. Por fim a definição pan-resistente (*pandrug-resistant - PDR*) engloba as bactérias do gênero *Acinetobacter* que não são suscetíveis a todos os agentes antimicrobianos em todas as classes testadas.⁽¹³⁾

Os carbapenêmicos, β -lactâmicos de amplo espectro, foram introduzidos na década de 80 e desde então são os mais importantes agentes no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* multiresistentes, entretanto relatos de resistência a esses fármacos são observados em todo o mundo, restringindo o tratamento das infecções causadas por esse patógeno a novos antimicrobianos como a tigeciclina ou ao uso das polimixinas (polimixina B e colistina).⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

A resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* é observada em escala global, com relatos de surtos de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (ABCR) por todo o mundo.⁽¹³⁾ Estudos indicam que os isolados de ABCR têm aumentado gradativamente durante os últimos dez anos na Europa, América do Norte e América Latina. Surtos causados por ABCR já foram relatados em países do mundo todo como Espanha, Portugal, Holanda,

Grécia, Itália, Turquia, Líbano, Argentina, Brasil, África do Sul, Japão, China, Taiwan, Coréia do Sul e Austrália.^(16,17) Dados do SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* revelaram que entre os anos de 2006-2009 a resistência global ao imipenem em *Acinetobacter* spp. era de aproximadamente 56% e na América Latina de 48.3%.⁽¹⁸⁾ Segundo Rossi (2011), a taxa média de resistência aos carbapenêmicos em amostras de *A. baumannii* isolados no Brasil varia entre 25% e 45%.⁽¹⁹⁾ Essa resistência é mediada pelos principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos conhecidos e que ocorrem nos bacilos Gram-negativos (BGN), incluindo: inativação enzimática do fármaco, hiperprodução de sistemas de efluxo, diminuição do influxo de antimicrobianos e alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (*penicillin binding proteins* - PBPs).⁽¹⁶⁾

O gênero *Acinetobacter* é intrinsecamente menos suscetível aos agentes antimicrobianos quando comparado com as enterobactérias. A permeabilidade da membrana externa de *A. baumannii* é 5.0% inferior em comparação com outros bacilos Gram-negativos, devido ao fato de apresentar menor número e um menor tamanho de porinas, também denominadas OMPs (*outer membrane protein*). Essas proteínas transmembranas, formam poros na membrana externa das bactérias e são responsáveis pela difusão de pequenos metabólitos e moléculas hidrofílicas.⁽¹⁵⁾ A expressão diminuída ou ausência de três OMPs, 33–36-kDa, 29-kDa (CarO) e 43-kDa (homóloga à porina OprD de *Pseudomonas aeruginosa*, frequentemente associada a resistência a imipenem) têm sido descritas entre as cepas de *A. baumannii* como responsáveis por um aumento na concentração inibitória mínima (CIM) aos carbapenêmicos, principalmente ao imipenem.⁽¹⁶⁾

Os sistemas de efluxo ativo constituem mecanismos de resistência capazes de abranger classes estruturalmente distintas de antimicrobianos e exportá-las da célula bacteriana.⁽¹⁴⁾ O sistema de efluxo AdeABC é composto de três unidades, onde AdeA é a proteína de fusão da membrana, AdeB é o transportador dos antimicrobianos, e AdeC é a OMP. A hiperprodução desse sistema de efluxo confere resistência aos aminoglicosídeos, β -lactâmicos, cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina, e susceptibilidade reduzida às

fluoroquinolonas, sendo o sistema mais importante na resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*, principalmente ao meropenem.^(16,20)

A produção de β -lactamases capazes de hidrolizar os carbapenêmicos constitui o principal mecanismo responsável pela resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*. Os genes codificadores dessas β -lactamases estão associados a elementos genéticos móveis como transposons, integrons e plasmídeos, podendo ser transferidos horizontalmente.⁽⁴⁾ As β -lactamases descritas são classificadas de acordo com a comparação em sua sequência aminoácida (classificação de Ambler)⁽²¹⁾ ou com suas características funcionais (classificação de Bush e Jacoby).⁽²²⁾ As β -lactamases com atividade de carbapenemases descritas em *A. baumannii* incluem as OXA-carbapenemases, também conhecidas como carbapenemases da classe D de Ambler capazes de hidrolisar carbapenêmicos (CHDL – *carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase*), as metalo-beta-lactamases (MBL), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e Guiana extended spectrum carbapenemase (GES-carbapenemase).^(16,23)

Esta revisão sumariza as carbapenemases detectadas em *A. baumannii*, sua distribuição mundial e seu contexto genético, com ênfase nas OXA-carbapenemases.

Plataformas genéticas das carbapenemases em *A. baumannii*

Integrons

Integrons correspondem a elementos genéticos capazes de adquirir e reorganizar as fases abertas de leitura (*open reading frames* – ORFs) presentes nos cassetes gênicos, convertendo essas estruturas em genes funcionais, garantindo sua expressão. Tal evento é realizado por um sistema denominado “recombinação sítio-específica”.⁽³⁾ Os integrons não apresentam autonomia de movimentação, entretanto são responsáveis pela disseminação horizontal da resistência bacteriana por acumularem determinantes de resistência e por estarem associados a elementos genéticos móveis como transposons e plasmídeos.^(24,25)

A estrutura mínima de integron inclui: 1- um gene *intl* (que codifica uma recombinase sítio-específica, denominada integrase), 2- um sítio adjacente de recombinação denominado *attI* (*attachment site - integron*). Essas duas estruturas: *intl* e *attI* são conhecidas como sequência conservada 5' do integron (5'-CS). A integrase, que pertence à família das tirosina-recombinases, cataliza a recombinação entre as sequências específicas, do integron e do gene a ser capturado. O gene *intl* contém um promotor próprio, conhecido por Pc, fazendo do integron, além de um elemento de aquisição, um elemento de expressão dos genes.^(139,1426-280)

Os integrons são classificados de acordo com a estrutura de sua integrase, os pertencentes a classe 1 e 2 geralmente contêm os genes responsáveis pela resistência aos antimicrobianos.⁽²⁹⁾ Os integrons da classe 1 além de possuírem a estrutura conservada 5'-CS, que caracteriza um integron, possuem na extremidade 3' um gene que codifica resistência a compostos de amônio quaternário de nominado *qacEΔ1* truncado ao um gene codificador de resistência à sulfonamida *sul1*. Essa região é conservada nos integrons pertencentes a classe 1 e é denominada 3'-CS.⁽³⁰⁾

Os genes cassetes são pequenas estruturas não-replicantes de DNA, normalmente na ordem de 500-1000pb. Esses genes podem estar em sua forma livre circular ou então inseridos no integrons. Quando associados aos integrons são considerados partes desse elemento, podendo assim, serem expressos.⁽²⁹⁻³²⁾ A inserção dos genes cassetes ao integron receptor se dá pela recombinação do sítio *attI* do integron ao sítio *attC* (*attachment site - cassette*). Além disso a integrase pode catalisar a recombinação entre duas unidade *attC*, uma do novo casste a ser integrado e outra num gene cassette que já faz parte do integron. Algumas evidências mostram que a integrase realiza preferencialmente a recombinação entre *attI* e o *attC*, sugerindo que o gene localizado na primeira posição do integron é o determinante mais recentemente adquirido pelo integron em questão. A integrase também catalisa eventos de recombinação que levam à excisão de genes cassetes, ocasionando a perda dos mesmos e gerando um cassette circular livre.^(31,33)

Transposons

Transposons são elementos genéticos com autonomia de movimentação no DNA, sua mobilidade ocorre por um evento denominado transposição, pois codificam sua própria enzima envolvida nesse evento, a transposase. Outra característica importante dos transposons, que os distingue de outros elementos genéticos móveis, é a presença de sequências repetidas invertidas (IR) em suas extremidades e de repetições diretas que flanqueiam o transposon no DNA receptor. Tais estruturas existem em praticamente todos os organismos, porém, a ação dos transposons é melhor compreendida em bactérias, organismos cuja evolução se deve, em grande parte, a estes elementos.^(34,35)

As sequências de inserção (IS) correspondem aos menores transposons bacterianos, apresentando poucos pares de base (<2.5 kb), além da sequência de nucleotídeos que codifica a transposase. As ISs desempenham três funções básicas em bactérias: codificam sua transposase (o que a torna um elemento móvel); possuem sequência promotoras que ativam genes silenciosos ou aumentam a expressão de determinantes de resistência quando localizam-se *upstream* à eles; mobilizam genes entre introns, outros transposons, plasmídeos e cromossomos, aumentando a probabilidade de um gene de resistência tornar-se transmissível.⁽³⁾ Mais de 30 ISs foram identificadas em *Acinetobacter* spp. e pelo menos 19 tipos estão associadas às β -lactamases, principalmente às CHDLs. A principal IS detectada em *A. baumannii* é a ISAba1, entretanto, ISAba2, ISAba3, ISAba4, ISAba10, ISAba125, ISAba825 e IS18 já foram relatadas. ISAba1 foi detectada em 80% de 50 isolados coletados de 20 diferentes países em todo o mundo.^(3,16)

OXA-carbapenemases

As oxacilinas são β -lactamases classificadas como pertencentes à classe D de Ambler ou aos grupos 2d, 2de e 2df segundo Bush e Jacoby^(21,22), receberam essa denominação por sua alta atividade hidrolítica contra oxacilina, cloxacilina e metilicina. Possuem um resíduo serina em seu sítio ativo e geralmente são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e

sulbactam. As OXAs pertencem à classe das β -lactamases mais diversificada enzimaticamente. A diversidade é observada nos níveis estruturais e bioquímicos, com enzimas que possuem tanto um espectro reduzido quanto ampliado de hidrólise aos diversos β -lactâmicos.⁽³⁶⁾

As OXA-carbapenemases ou CHDLs são as carbapenemases mais descritas entre as espécies do gênero *Acinetobacter*. Possuem baixa atividade hidrolítica contra o imipenem e meropenem, geralmente não hidrolizam cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam. Em geral a hidrólise do imipenem, mesmo que lenta, é mais rápida que a do meropenem.⁽³⁷⁾ Portanto, isolados clínicos produtores de CHDLs que possuem concentração inibitória mínima (CIM) para os carbapenêmicos acima dos pontos de corte pré-estabelecidos provavelmente apresentam mecanismos de resistência adicionais, como hiperprodução de sistemas de efluxo, diminuição da permeabilidade ou modificação das PBPs.⁽¹⁶⁾

As CHDLs em *Acinetobacter* spp. são divididas em cinco subgrupos filogenéticos, quatro deles correspondem à CHDLs adquiridas: OXA-23-like (variantes OXA-23, -27, -49, -102, -103, -105, -133, -146, -165 a -171), OXA-24/33/40-like (variantes OXA-24/33/40, -25, -26, -72, -139, -160, -182), OXA-58-like (variantes OXA-58, -96, -97, -164) e a CHDL recentemente descrita OXA-143 (variantes OXA-143 e -231). Um último subgrupo, OXA-51-like, corresponde às carbapenemases de ocorrência natural ou intrínseca descritas à espécie *A. baumannii*.^(6,38) Algumas variantes de CHDLs descritas na Tabela 1 e não são mencionadas no texto a seguir pois são apenas sequências depositadas no GenBank.

Os genes codificadores do grupo OXA-24/33/40 estão geralmente localizados no cromossomo, enquanto os genes que codificam o grupo das OXA-23, OXA-58 e OXA-143 foram identificados principalmente em plasmídeos, transposons ou associados à sequências de inserção, o que pode ajudar a explicar sua maior facilidade de disseminação.⁽³⁷⁾

A primeira CHDL descrita foi a ARI-1 (*Acinetobacter baumannii* resistente ao imipenem), posteriormente denominada OXA-23, foi detectada em um isolado de *A. baumannii* na Escócia em 1985. A habilidade da OXA-23 em hidrolizar carbapenêmicos é fraca, apenas com baixa atividade contra o

imipenem. Entretanto, comparada à atividade hidrolítica de outras β -lactamases da classe D essa taxa de hidrólise é significativa, o que levou a β -lactamase OXA-23 ser denominada carbapenemase.^(38,39)

O gene *bla*_{OXA-23}, codificador da OXA-23, é considerado constitutivo à espécie *Acinetobacter radioresistens*, uma espécie ambiental, sendo esse microrganismo a provável reservatório de *bla*_{OXA-23} para outras espécies do gênero.⁽⁴⁰⁾ Esse gene foi identificado em isolados clínicos de *A. baumannii* em vários continentes, localizado em plasmídeos ou no cromossomo e é considerado o gene codificador de CHDL mais disseminado no mundo.⁽¹⁴⁾ Isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23 foram detectados na França, Bulgária, Irã, Emirados Árabes, Tunísia, Brasil, Austrália, Polinésia, Colômbia, Reino Unido, Turquia, China e Coreia.⁽⁴¹⁻⁵⁴⁾ As variantes enzimáticas OXA-27 e OXA-49 foram descritas em Singapura e China, respectivamente.^(55,56)

No Brasil ABRC portador do gene *bla*_{OXA-23} foi isolado pela primeira vez no ano de 2003, em Curitiba, 14 anos após esse gene ter sido detectado na Escócia.⁽⁴⁶⁾ Atualmente o gene foi detectado em isolados de *A. baumannii* no Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná.⁽⁵⁷⁻⁶⁰⁾ Um estudo recente, realizado no Rio de Janeiro, detectou que isolados de *A. baumannii* sensíveis aos carbapênicos eram portadores do gene *bla*_{OXA-23}, evidenciando a possível disseminação silenciosa de tal determinante de resistência.⁽⁶¹⁾ Outro estudo importante isolou o gene *bla*_{OXA-23} em 3 cepas de *A. baumannii* coletados em águas residuais de hospitais de Porto Alegre, indicando que esses genes estão sendo liberados do esgoto hospitalar para o ambiente e que essas águas residuais podem ser cruciais para o desenvolvimento e disseminação de bactérias multiresistentes.⁽⁶²⁾

O segundo grupo das CHDLs, OXA-24/33/40, é assim denominado pois essas três variantes possuem sequências aminoácidas idênticas mas a elas foram atribuídos nomes diferentes no GenBank.⁽³⁾ O primeiro relato do grupo ocorreu na Espanha, identificado no cromossomo de um isolado de ABRC.^(63,64) O gene *bla*_{OXA-23/33/40} foi identificado em diversas áreas do mundo, principalmente na Espanha, Portugal e Estados Unidos.⁽⁶⁵⁻⁷⁰⁾ As variantes OXA-25, OXA-26, OXA-160 e OXA-182 foram detectadas em isolados de ABRC recuperados na Espanha, Bélgica, Estados Unidos e Coreia,

respectivamente.^(55,71,72) Cepas de ABRC portadoras do gene codificador da variante OXA-72 foram isoladas na China, Coréia do Sul, Taiwan e Barém, no Golfo Pérsico.⁽⁷³⁻⁷⁶⁾ No Brasil, até o momento, os únicos relatos do grupo ocorreram em São Paulo, onde foram identificados isolados de ABRC portadores da variante OXA-72.^(77,78)

Um estudo realizado na Espanha detectou um mecanismo adicional de transferência do gene *bla*_{OXA-24} entre espécies de *A. baumannii*, por meio vesículas de membrana externa (*outer membrane vesicles*, OMV). Este estudo consitiu a primeira evidência de que isolados clínicos de *A. baumannii* podem liberar essas vesículas como um mecanismo de transferência horizontal de genes de resistência aos carbapenêmicos, uma vez que as OMVs funcionaram como moléculas efetoras transportadoras destes genes de resistência *in vitro*.^(79,80)

O grupo OXA-58 foi detectado primeiramente em um isolado clínico de *A. baumannii* multiresistente, que deu origem a um surto local em um hospital da França.^(81,82) *A. baumannii* portadores de *bla*_{OXA-58} foram isolados na Argentina, Austrália, Estados Unidos, França, Bélgica, Itália, Turquia, Grécia.⁽⁸³⁻⁹³⁾ As variantes OXA-96, OXA-97 e OXA-164 foram detectados em isolados de *A. baumannii* em Singapura, na Tunísia e Alemanha, respectivamente.⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾ No Brasil, os relatos de ABRC portadores do gene *bla*_{OXA-58} ocorreram no Rio de Janeiro e em São Paulo.^(97,78)

A mais recente CHDL, OXA-143, foi identificada em um isolado clínico ABRC, recuperado de uma cultura de sangue em São Paulo, Brasil. Até o momento os relatos de OXA-143 estão restritos ao Brasil, especialmente na região sudeste, contudo sua prevalência nas demais regiões do país e do mundo ainda precisa ser determinada.^(78,98,99) A primeira variante enzimática do grupo, OXA-231 (*accession number* JQ676953), foi detectada em um isolado de ABRC no Hospital Universitário de Londrina, Paraná, por nosso grupo de pesquisa (dados submetidos à revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*). OXA-143 não tem sido relacionado a integrons ou transposons, entretanto o gene codificador dessa carbapenemase encontra-se flanqueado por duas cópias de uma mesma replicase, sugerindo que sua aquisição pode ter ocorrido por um processo de recombinação homóloga.⁽⁹⁸⁾

O grupo OXA-51, que, diferente dos grupos anteriormente citados, é de ocorrência natural ou intrínseca em *A. baumannii*, é a CHDL que possui maior número de variantes enzimáticas descritas.^(38,100-104) A β -lactamase OXA-51 pode conferir resistência aos carbapenêmicos quando sequências de inserção localizam-se *upstream* aos genes codificadores dessa carbapenemase. IS*Aba1* e IS*Aba9* foram identificadas *upstream* ao gene *bla*_{OXA-51-like}, funcionando como sequências promotoras e aumentando seu nível de expressão.⁽³⁸⁾

Klebssiella pneumoniae carbapenemase

A *Klebssiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) é uma carbapenemase pertencente a classe A de Ambler e ao grupo 2f de Bush e Jacoby.^(21,22) Foi identificada pela primeira vez em 2001 entre isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos na Carolina do Norte, Estados Unidos.⁽¹⁰⁵⁾ Esta carbapenemase é capaz de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, inclusive as de terceira geração (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona), aztreonam e carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem), e é fracamente inibida pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam.^(106,107) Até a realização deste trabalho 12 grupos de KPCs haviam sido descritos mundialmente entre espécies da família Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (<http://www.lahey.org/Studies>, ultimo acesso em fevereiro de 2012).⁽¹⁰⁸⁾ Relatos de *A. baumannii* produtores de KPC atualmente são restritos à Porto Rico, onde foram identificadas as variantes KPC-2, -3, -4 e -10.^(109,110)

O gene *bla*_{KPC} está associado à transposons. Um estudo feito por Nass e colaboradores (2008) identificou o transposon *Tn4401* como o responsável pela aquisição e disseminação do gene entre diversos microrganismos. Os autores mostraram que esse transposon está presente em diferentes espécies bacterianas de diferentes origens geográficas, sustentando a hipótese que o *Tn4401* pode estar relacionado à origem da disseminação deste determinante de resistência.^(111,112)

GES-carbapenemase

Originalmente as enzimas denominadas *Guiana Extended Spectrum* (GES) foram classificadas no grupo das β -lactamases de espectro extenso (*Extended Spectrum β -lactamases* – ESBL) e caracterizadas por possuírem atividade contra penicilinas e cefalosporinas de amplo-espectro, principalmente ceftazidima e cefotaxima. As ESBLs pertencem a classe A e D de Ambler e aos grupos funcionais 2be, 2ber, 2de, 2e e 2f de Bush e Jacoby.^(21,22) As famílias de enzimas identificadas como ESBL são denominadas: SHV, TEM, CTX-M, GES, OXA, VEB, PER, BEL, BES, SCO, e CARB.⁽¹¹³⁾ Em *Acinetobacter* spp. 8 famílias de ESBL foram detectadas: TEM, SHV, CARB, CTX-M, SCO, PER, VEB e GES em diversas regiões do mundo.⁽³⁾

GES são enzimas peculiares, dado que mutações pontuais que levem à substituição de aminoácidos em seus sítios ativos podem aumentar seu espectro de catálise, incluindo a hidrólise dos carbapenêmicos, descritas como GES-carbapenemase.⁽¹⁶⁾ As variantes de GES com atividade de carbapenemase encontrada em *A. baumannii* são: GES-11, -12 e -14, e estão geralmente associadas à integrons. GES-11, a primeira GES isolada em *A. baumannii*, foi detectada na França em 2009.⁽²³⁾ Em 2010 um estudo relatou isolados clínicos de *A. baumannii* portadores de GES-11, -12 e -14 na Bélgica.⁽¹¹⁴⁾ Relatos de GES-carbapenemase estão restritos à Europa e sua disseminação no mundo ainda precisa ser estabelecida.

Metallo-beta-lactamases

As metallo-beta-lactamases (MBL) são classificadas na classe B de Ambler e, segundo Bush e Jacoby, aos grupos 3a e 3b.^(21,22) Receberam essa denominação porque utilizam um ou dois íons zinco (Zn^{+2}) ou outros cátions divalentes no seu sítio ativo para catalisar a hidrólise do anel β -lactâmico, dessa forma, as MBL são inibidas por quelantes metálicos, como o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Essas enzimas são capazes de inativar todas as classes de β -lactâmicos, com exceção apenas do aztreonam,

exercendo uma atividade hidrolítica eficiente e constante sobre a classe mais estável de β -lactâmicos, os carbapenêmicos.^(115,116)

As MBLs constituem o grupo mais relevante de carbapenemases detectados na atualidade e o determinante de resistência aos carbapenêmicos de maior prevalência isolado de patógenos clinicamente importantes como *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e outras espécies da família Enterobacteriaceae, sendo a principal carbapenemase detectada em *P. aeruginosa*. O significado clínico das MBLs é ainda mais relevante pela falta de inibidores clínicos disponíveis atualmente e pela capacidade de transferência de seus genes entre diferentes espécies bacterianas.⁽¹¹⁷⁻¹¹⁹⁾

Oito subclasse de MBLs adquiridas incluindo: IMPs, VIMs, SPM-1, GIM-1, AIM-1, SIM-1, NDM-1 e DIM-1 foram descritas. De todo o grupo das MBLs as IMPs, VIMs e NDMs se destacam como as mais disseminadas e detectadas em todo o mundo.⁽¹²⁰⁾ As MBLs adquiridas são tipicamente encontradas como genes cassettes inseridos em integrons, em sua maioria aos integrons pertencentes à classe 1.⁽¹²¹⁾

A subclasse IMP (*Imipenemase*), foi relatada pela primeira vez em 1991, a partir de uma cepa de *Serratia marcescens* resistente ao imipenem isolada no Japão. Hoje as IMPs são descritas em distintos microrganismos em todo o mundo com maior predominância na região do sudeste Asiático.⁽¹²²⁻¹²³⁾ As variantes IMP-1, -2, -3, -4, -5, -6, -8, -11 e -19 foram detectadas em isolados de *A. baumannii* da Itália, Japão, Coreia do Sul, Hong Kong, Austrália e Portugal.^(117,124-131)

No Brasil, a MBL IMP-1 foi detectada em isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos e sensíveis, *in vitro*, apenas a colistina e ampicilina-sulbactam, no Hospital São Paulo, na região sudeste do país. Um estudo feito no período de 1994 a 2001 nesse mesmo hospital mostrou que os isolados de *A. baumannii* produtores de IMP-1 emergiram na instituição desde 1998, encontrados em 17 ribogrupos diferentes, indicando que essa MBL é um importante mecanismo de resistência disseminado em clones distintos nesse hospital. Até a presente data, essa é a única região do Brasil onde há relatos publicados da ocorrência de MBL em *A. baumannii*.^(132,133)

A segunda subclasse de MBL detectada em *A. baumannii* foi denominada VIM por ter sido isolada de uma amostra clínica de *P. aeruginosa* recuperada da ferida cirúrgica de uma paciente hospitalizada na UTI no Hospital Universitário de Verona (VIM- *Veronese Imipenemase*).⁽¹³⁴⁾ Essas enzimas são comuns na Europa, onde a variante VIM-2 é predominante. VIM-2 é, provavelmente, a carbapenemase mais disseminada em todo o mundo, entretanto, relatos de VIM em *A. baumannii* são menos frequentes que os relatos de IMP. As variantes da subclasse VIM -1, -2, -3, -4 e -11 foram detadas em isolados de *A. baumannii* na Grécia, Coréia do Sul, Índia e Taiwan.^(120,131, 135-137)

A subclasse SIM (*Seoul Imipenemase*) foi identificada pela primeira vez em *A. baumannii* isolados de escarro e amostras de urina de pacientes com infecções no trato urinário e pneumonia, em Seoul na Coréia, estando, a princípio, restrita a essa espécie e região.⁽¹³⁸⁾ Entretanto, um estudo recente detectou a MBL SIM-1 coexistindo com a CHDL OXA-23 em um isolado de *Acinetobacter baylyi* resistente aos carbapenêmicos na China.⁽¹³⁹⁾

A subclasse GIM recebeu esse nome por ser detectada pela primeira vez em isolados de *P. aeruginosa* multiresistentes coletadas de diferentes pacientes em Dusseldorf, Alemanha.⁽¹⁴⁰⁾ Nelly e Raafat relataram pela primeira vez a variante GIM-1 em *A. baumannii* isolados de um hospital universitário no Egito, em 2011.⁽¹⁴¹⁾ O estudo pesquisou a presença de MBL em 23 amostras de *A. baumannii* não-repetidas e resistentes ao imipenem coletadas em um período de 4 meses. A variante GIM-1 foi positiva em apenas um isolado.

A MBL SPM (*São Paulo metalo-beta-lactamase*) foi descrita pela primeira vez em uma amostra de *P. aeruginosa* obtida a partir de uma cultura de urina de uma paciente com leucemia linfoblástica aguda, hospitalizada no Complexo Hospitalar São Paulo, em São Paulo, Brasil, no ano de 2001.⁽¹⁴²⁾ A disseminação epidêmica de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 já foi evidenciada em vários estados brasileiros.⁽¹⁴³⁾ Em 2011 Shahcheraghi e colaboradores descreveram a subclasse SPM-1 em seis amostras de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos isoladas de pacientes hospitalizados no Iran.⁽¹⁴⁴⁾ Além disso, em dois desses isolados houve a coexistência dos gene *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA-23} e *bla*_{GES-1}. Esse é o único relato dessa

MBL em *A. baumannii*, além de ser o primeiro caso em outro hospedeiro bacteriano.

A nova subclasse de MBL, *New Delhi metallo-beta-lactamase* (NDM), foi relatada pela primeira vez em 2009 em um paciente Sueco, que viajou para Nova Delhi e adquiriu uma infecção urinária causada por *K. pneumoniae*.⁽¹⁴⁵⁾ Desde a data essa carbapenemase tem sido descrita em todo o mundo, principalmente em bactérias de pacientes epidemiologicamente ligados ao continente indiano, ocorrendo em infecções hospitalares e comunitárias. Atualmente essas enzimas estão presentes na família Enterobacteriaceae, Vibrionaceae e em bacilos Gram-negativos não-fermentadores. A rápida disseminação da NDM está relacionada a transferência do gene *bla*_{NDM-like} entre plamídeos altamente conjugativos e a surtos clonais.⁽¹⁴⁶⁾

Em *A. baumannii* a MBL NDM foi detectada pela primeira vez em três isolados resistentes aos carbapenêmicos recuperados na Índia. Além do gene *bla*_{NDM-1}, esses isolados eram também portadores do gene *bla*_{OXA-23}.⁽¹⁴⁷⁾ O gene *bla*_{NDM} também foi detectado em isolados de *A. baumannii* recuperados na Alemanha, China, Egito e Israel.⁽¹⁴⁸⁻¹⁵¹⁾ Na China, um estudo detectou isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos com a coexistência de 3 subgrupos de carbapenemases: *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{OXA-23}. Esses relatos evidenciam a emergência da coexistência de carbapenemases em *A. baumannii*, o que pode limitar, ainda mais, o futuro das opções terapêuticas no tratamento das infecções causadas por este patógeno.⁽¹⁵²⁾

Conclusão

A espécie *A. baumannii* é a mais importante espécie do gênero *Acinetobacter*, relacionada às infecções hospitalares, devido à sua habilidade de sobreviver em condições de dessecação e de adquirir diversos mecanismos de resistência. Os carbapenêmicos são os β -lactâmicos mais utilizados no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* multi-resistentes, entretanto, relatos de resistência a esses fármacos são descritos em todo o mundo. As carbapenemases constituem o mecanismo mais preocupante na resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*. As OXA-

carbapenemases, MBL e KPC, e a coexistência dessas enzimas em isolados de *A. baumannii*, são descritas em diferentes regiões do mundo.

A disseminação global das carbapenemases em *A. baumannii* evidencia a necessidade do monitoramento desses potentes determinantes de resistência para uma diminuição no impacto clínico desse patógeno no ambiente hospitalar; gerando melhorias no controle, tratamento e diagnóstico das infecções causadas por esse microrganismo. A cada ano novas carbapenemases e novas variantes enzimáticas vêm sendo descritas na literatura mostrando que sua detecção e disseminação é uma história à ser escrita.

Referências

1. Doughari JH, Ndakidemi, PA, Human IS, Benade S. The Ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ.* 2011; 26:101-112.
2. Rossau R, Van Landschoot A, Gillis M, Ley J. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991; 41:310-319.
3. Zhao WH, Hu ZQ. *Acinetobacter*: a potential reservoir and dispenser for β -lactamases. *Crit. Rev. Microbiol.* 2012; 38:30-51.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Overview of drug-resistant *Acinetobacter* infections in healthcare settings. Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_acinetobacter.html. (Accessed February 2012).
5. Neely NA, A survey of Gram-negative bacteria survival on hospital fabrics and plastics. *J. Burn Care Rehabil.* 2000, 21:523-527.
6. Esterly J, Richardson CL, Eltoukhy NS, Qi C, Scheetz MH. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Ann. Pharmacother.* 2011; 45.
7. Nemec A, Krizova L, Maixnerova L, van der Reidjen TJ, Deschaght P, Passet V et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res. Microbiol* 2011; 162:393-404.
8. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Microbiol.* 2007; 5:939-951.
9. Huys G, Bartie K, Cnockaert M, Hoang Oanh DT, Phuong NT, Somsiri T et al. Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. *Res. Microbiol.* 2007; 158:228-235.
10. La Scola B, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10:1671-1673.
11. Cateau E, Verdon J, Fernandez B, Hechard Y, Rodier MH. *Acanthamoeba* sp. promotes the survival and growth of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol.* 2011; 319:19-25.
12. Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Athanassios T. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2009; 3:335-341.
13. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012, 18:268-281.

14. Poirel L, Normann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12:826-836.
15. Lee K, Dongeun Y, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Med.* 2011; 52:879-891.
16. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2010; 8:71-93.
17. Nordmann P. Gram-negative bacterial with resistance to carbapenems. *Med. Sci (Paris)*, 2010; 11: 950-959.
18. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66: 2070-2074.2011.
19. Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 9: 1138-1143.
20. Ma Z, Cai SX, Tong WC, Ruan SC, Wang H. Role of the AdeABC efflux pump in carbapenems resistance of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Nan. Fang. Yi Ke Da Xue. Xue Bao.* 2011; 8:1378-1381.
21. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1980; 289:321-331.
22. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54:969-679.
23. Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Couvarlin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2009; 53:3579-3581.
24. Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. *Annu. Rev. Genet.* 2010; 44:141-66.
25. Walsh TR. Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006; 9:476-482.
26. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* 1995; 15:593-600.
27. Collis CM, Hall RM. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* 1992; 19:2875-2885.
28. Di Conza JA, Gutkind GO. Integrones: los coleccionistas de genes. *Rev. Argentina Microbiol.* 2010; 42:63-78.
29. Partridge SR, Tsafnat G, Coeira E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol.* 2009; 33:757-784.
30. Hall RM. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance gene in Gram-negative bacteria. *Ciba Found Symp.* 1997; 207:192-202.
31. Recchia GD, Hall RM. Origins of mobile genes cassettes found in integrons. *Trends Microbiol.* 1997; 5:389-394.

32. Tsafnat G, Partridge SR, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* 2009; 33:757-784.
33. Di Conza JA, Gutkind GO. Integrons: gene collectors. *Rev. Argent Microbiol.* 2010; 42:63-78.
34. Choi KH, Kim KJ. Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19:217-28.
35. Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999; 63:507-522.
36. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 24:1211-1233.
37. Garnacho-Monteiro J, Amaya-Villar R. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2010; 23:332-339
38. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54:24-38.
39. Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44:196-199.
40. Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52:1252-1256.
41. Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51:1530-1533.
42. Stoeva T, Higgins PG, Bojkova K, Seifert H. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008; 14:723-727.
43. 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. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2008; 61:247-278.
44. Mugnier P, Poirel L, Pitout M, Nordmann P. Carbapenem-resistant and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in the United Arab Emirates. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008; 14:879-882.
45. Mansour W, Poirel L, Bettaieh D, Bouallegue O, Boujaafar N, Nordmann P. Dissemination of OXA-23-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Tunisia. *Microb. Drug Resist.* 2008; 14:289-292.
46. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:3403-3406.
47. Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, van der Reijden T, Dijkshoorns L, Iredell J. Horizontal gene transfer in a polyclonal

- outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 2007; 45:453-460.
48. Naas T, Levy M, Hirschauer C, Marchandin H, Nordmann P. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:4826-4829.
 49. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. 2007; 51:2001-2004.
 50. Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young, D, Lee JH, Song JS, Lee SH. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:2241-2245.
 51. Meric M, Kasap M, Gacar G, Budak F, Dundar D, Kolayli F et al. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Turkey. FEMS Microbiol. 2008; 282:214-218.
 52. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Tuton JF, Ward ME, Brown S et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int. J. Antimicrob. 2006; 27:351-353.
 53. Zong Z, Lü X, Valenzuela JK, Partridge SR, Iredell J. Na outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase in western China. Int. J. Antimicrob. Agents 2008; 31:50-54.
 54. Kim JW, Heo ST, Jun JS, Choi CH, Lee YC, Jeong YG et al. Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*_{OXA-23}, *bla*_{PER-1} and *armA* in a Korean hospital. Clin. Microbiol. Infect. 2008; 14:716-718.
 55. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents. Chemother. 2001; 45:583-588.
 56. Brown S, Amyes S. OXA β -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. J. Antimicrob. Chemother. 2006; 57:1-3.
 57. Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Int. J. Antimicrob. Agents 2009; 34:25-28.
 58. Mostachio AK, van der Heidjen I, Rossi F, Levin AS, Costa SF. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. J. Med. Microbiol. 2009; 58:1522-1524.
 59. Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in southern Brazil. Infection 2009; 37:474-476.
 60. Carneiro MC, Barbosa PIPL, Vespero EC, Tanita MT, Carrilho CM, Perugini M et al. Carbapenem-resistant OXA-23-producing

- Acinetobacter baumannii* isolates causing ventilator-associated pneumonia. Am. J. Infect. Control 2010; 38:667-669.
61. Carvalho KR, Carvalho-Assef APD, 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.
 62. Ferreria AE, Marchetti DP, De Oliveira LM, Gusatti CS, Fuentefria DB, Corção G. Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in southern Brazil. Microb. Drug Resist. 2011; 17:221-227.
 63. Bou G, Cervero G, Angeles Domingues M, Quereda C, Martinez-Beltran J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. J. Clin. Microbiol. 2000; 38:3299-3305.
 64. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran A. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44:1556-1561.
 65. Da Silva GJ, Quinteira S, Bertolo E, Sousa JC, Gallego L, Duarte A et al. Long-term dissemination of a OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in Iberian Peninsula. J. Antimicrob. Chemother. 2004; 54:255-258.
 66. Peixe L. Emergence of carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 1999; 37:2109-2110.
 67. Quinteira S, Grosso F, Ramos H, Peixe L. Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital. Antimicrob. Agents Chemother. 2007; 51:3465-3466.
 68. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. High prevalence of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. Clin. Microbiol. Infect. 2007; 13:1192-1198.
 69. Lolans K, Rice TW, Munhoz-Price S, Quinn JP. Multicity outbreak of carbapenem-resistant OXA-40. Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50:2941-2945.
 70. Qi C, Malczynski M, Parker M, Scheetz MH. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. J. Clin. Microbiol. 2008; 46:1106-1109.
 71. Tian GB, Adams-Haduch JM, Bogdanovich T, Pasculle AW, Quinn JP, Wang HN, Doi Y. Identification of diverse OXA-40 group carbapenemase, including a novel variant, OXA-160, from *Acinetobacter baumannii* in Pennsylvania. Antimicrob. Agents Chemother. 2011; 55:429-432.
 72. Kim CK, Lee Y, Lee H, Woo GJ, Song W, Kim MN, Lee WG, Jeong SH, Lee K, Chong Y. Prevalence and diversity of carbapenemases among

- imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter* isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 68:432-438.
73. Lee K, Kim MN, Choi TY, Cho SE, Lee S, Whang DH *et al.* Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009; 33:520-524.
 74. Lu PL, Doumith M, Livermore DM, Chen TP, Woodford N. Diversity of carbapenem resistance mechanism in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-born OXA-72 carbapenemase. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 63:641-647.
 75. Mugnier PD, Bindaayna KM, Poirel L, Nordmann P. Diversity of plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing oxacilinases among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Kingdom of Bahrain. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 63:1071-1073.
 76. Wang H, Guo P, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M *et al.* Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51:4022-4028.
 77. Werneck JS, Picão RC, Carvalhaes CG, Gales AC. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66:452-454.
 78. Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuca EM, Elmor de Araújo MR, Lincopan N. High prevalence of carbapenem-resistant carrying the *bla*_{OXA-143} gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother* 2011; 55:1322-1323.
 79. Kwo SO, Gho YS, Lee JC, Kim SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol.* 2009; 297:150-156.
 80. Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC *et al.* Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance gene in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66:452-454.
 81. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49:202-208.
 82. Héritier C, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacilinase OXA-58. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 55:115-118.
 83. Castanheira M, Wanger A, Kruzel M, Deshpande LM, Jones RN. Emergence and clonal dissemination of OXA-24- and OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* strains Houston, Texas: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46:3179-3180.
 84. Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M *et al.* Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:3623-3627.

85. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore DM. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50:756-758.
86. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50:4114-4123.
87. Marqué S, Poirel L, Hértier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacilinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:4885-4888.
88. Peleg AY, Franklin C, Walters LJ, Bell JM, Spelman DW. OXA-58 and IMP-4 carbapenem-hydrolyzing β -lactamase in an *Acinetobacter junnii* blood culture isolate from Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50:399-400.
89. Bertini A, Giordano A, Varesi P, Villa L, Mancini C, Carattoli A. First report of the carbapenem-hydrolyzing oxacilinase OXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50:2268-2269.
90. Bogaerts P, Naas T, Wybo I, Bauraing C, Soetens O, Pierard D et al. Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:4189-4192.
91. Giordano A, Varesi P, Bertini A, Villa L, Dionisi AM, Vanditti M et al. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenem-hydrolyzing oxacilinase OXA-58 in Rome, Italy. *Microb. Drug. Resist.* 2007; 13:37-43.
92. Poirel L, Lebessi E, Hértier C, Patsoura A, Foustoukou M, Nordmann P. Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate in a pediatric hospital in Greece. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12:1138-1140.
93. Vahaboglu H, Budak F, Kasap M, Gacar G, Torol S, Karadenizli A et al. High prevalence of OXA-51-type class D β -lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centers. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58:537-542.
94. Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, Normann P. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacilinase OXA-97. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52:1613-1617.
95. Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 59:627-632.
96. Higgins PG, Schneiders T, Hamprecht A, Seifert H. In vivo selection of a missense mutation in *adeR* and conversion of the novel *bla*_{OXA-164} gene into *bla*_{OXA-58} in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospitalized patient. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54:5021-5027.

97. Figueiredo DQ, Santos KR, Pereira EM, Schuenck RP, Mendonça-Souza CR et al. First report of the *bla*_{OXA-58} gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2011; 106:368-370.
98. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert h. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53:5035-5038.
99. Werneck JS, Antonio CS, Picão RC, Girardello G, Cayô R, Marguti V et al. Low prevalence of *bla*_{OXA-143} in Private Hospital in Brazil. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2011; 55:4494-4495.
100. Brown S, Amyes S. OXA (β)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57:1-3.
101. Evans BA, Brown S, Harmouda A, Findlay J, Amyes SG. Eleven novel OXA-51-like enzymes from clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007; 13:1137-1138.
102. Tsakris A, Ikonomidis A, Spanakis N, Pournaras S, Bethimouti K. Identification of a novel *bla*(OXA-51) variant, *bla*(OXA-92), from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007; 13:348-349.
103. Vahaboglu H, Budak F, Kasap M, Gacar G, Torol S, Karadenizil A et al. High prevalence of OXA-51-type class D β -lactamases among isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centers. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58:537-542.
104. Brebone C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 2007; 74:1686-1701.
105. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet. Infect. Dis.* 2009; 9:228-236.
106. Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM. Comparative activities of doripenem versus isolates, mutants, and transconjugants of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* spp. with characterized beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48:1313-1319.
107. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45:1151-1161.
108. Sacha P, Ostas A, Jaworowska J, Wieczorek O, Ojdana D. Ratajczak J et al. The KPC type beta-lactamases: new enzymes that confer resistance to carbapenems in Gram-negative bacilli. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2009; 47:537-543.
109. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54:1354-1357.
110. Robledo IE, Aquino EE, Vázquez GJ. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55:2968-2970.

111. Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR, Jacobs MR, Levi MH, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Partial excision of *bla*_{KPC} from *Tn4401* in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56:1635-1638.
112. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52:1257-1263.
113. Rasmussen-Walther J, Hoiby N. Class A carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 60:470-482.
114. Bogaerts P, Naas T, El Garch F, Cuzon G, Deplano A, Delaire T, Huang TD, Lissior B, Nordmann P, Glupczynski Y. GES extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54:4872-4878.
115. Brebone C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 2007; 74:1686-1701.
116. Maltezou HC. Metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *Int. J. Antimicrob. Agents* 2008; 33:405-407.
117. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol.* 2005; 18:306-325.
118. Perez-Llarena FJ, Bou G. β -lactamase inhibitors: the story so far. *Curr. Med. Chem.* 2009; 16:3740-3765.
119. Zhao W-H, Hu Z-Q, Chen G, Matsushita K, Fukuchi K, Shimamura T. Characterization of imipenem-resistant *Serratia marcescens* producing IMP-type and TEM-type β -lactamase encoded on a single plasmid. *Microbiol. Res.* 2007; 162:46-52.
120. Zhao W-H, HU Z-Q. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Future. Microbiol.* 2011; 6:317-333.
121. Nicolau CJ, Oliver A. Carbapenemases in *Pseudomonas* spp. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2010; 1:19-28.
122. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsushashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35:147-151.
123. Osano E, Arakawa R, Wacharotayankun M, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshiimura F, Kato N. Molecular characterization of an Enterobacterial metallo-beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38:71-78.
124. Da Silva GJ, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa JC, Leitão R et al. Molecular characterization of *bla*_{IMP-5}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol.* 2002; 215:33-39.
125. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N et al. IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45:710-714.

126. Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM. Appearance of IMP-1 metallo- β -lactamase in Europe. *Lancet* 1999; 353:899-900.
127. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9:868-871.
128. Lim YM, Shin KS, Kim J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45:902-905.
129. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R et al. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* Ac-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44:1229-1235.
130. Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995; 36:585-586.
131. Yum JH, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim JM et al. Molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*_{VIM-2} gene cassettes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 49:837-840.
132. Gales AC, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 45:77-79.
133. Tognim MC, Gales AC, Penteado AP, Silbert S, Sader HS. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2006; 27:742-747.
134. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R et al. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43:1584-1590.
135. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouveleakis LS, Sofianou D, Legakis NJ. VIM-1 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12:981-983.
136. Figueiredo S, Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P. First identification of VIM-4 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol. Infect.* 2008; 14:289-290.
137. Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH. Molecular characterization of the metallo- β -lactamase gene in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2008; 32:475-480.
138. Lee K, Yum JH, Young D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD et al. Novel acquired metallo- β -lactamase gene *bla*_{SIM-1} in a class 1 integron

- from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49:4485-4491.
139. Zhou Z, Du X, Wang L, Yang Q, Fu Y, Yu Y. Clinical carbapenem-resistant *Acinetobacter baylyi* strain coharboring *bla_{SIM-1}* and *bla_{OXA-23}* from China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55:5347-5349.
 140. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla_{GIM-1}*, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48:4654-4661.
 141. Mohamed NM, Raafat D. Phenotypic and genotypic detection of metallo-beta-lactamases in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a tertiary hospital in Alexandria, Egypt. *Research J. Microbiol.* 2011; 10:750-760.
 142. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 50:673-679.
 143. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52:699-702.
 144. Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi MM, Ebrahimipour GH, Akbari N. Isolation and genetic characterization of metallo-β-lactamase and carbapenemase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iran J. Microbiol.* 2011; 2:68-74.
 145. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, 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 *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2009; 53:5046-5054.
 146. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore D. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011; Epub ahead of print.
 147. Karthikeyan K, Thirunaravan MA, Krishnan P. Coexistence of *bla_{OXA-23}* with *bla_{NDM-1}* and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J. Antimicrob. Chemother* 2010; 65:2253-2254.
 148. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J. Antimicrob. Chemother* 2011; 66:1255-1259.
 149. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66:1260-1262.
 150. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld KP et al. Molecular characterization of *bla_{NDM-1}* in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66:1998-2001.
 151. Espinal P, Fugazza G, López Y, Kasma M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S et al. Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter*

- baumannii* clone in an Israeli Rehabilitation Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55:5396-5398.
152. Chen Z, Qiu S, Wang Y, Wang Y, Liu S, Wang Z *et al.* Coexistence of *bla*_{NDM-1} with the prevalent *bla*_{OXA-23} and *bla*_{IMP} in pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in China. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 52:692-693.

Tabela 1. Carbapenemases adquiridas em *A. baumannii*

Grupo funcional de BUSH-JACOBY	Classe molecular de AMBLER	Grupo enzimático	Variantes enzimáticas	Número de acesso GenBank	Referências	
2be	A	GES	GES-11	FJ538287	Moubareck et al. 2009	
			GES-12	HM622145	Bogaerts et al. 2010	
			GES-14	GU207844	Bogaerts et al. 2010	
2f	A	KPC	KPC-2	AY034847	Robledo et al. 2010	
			KPC-3	AF395881	Robledo et al. 2010	
			KPC-4	AY700571	Robledo et al. 2010	
2d, 2de e 2df	D	OXA-23	OXA-23	EU594641	Donald et al. 2000	
			OXA-27	AF201828	Aftal-Shah et al. 2001	
			OXA-49	AY288523		
			OXA-146	FJ194494		
			OXA-165	HM488986		
			OXA-166	HM488987		
			OXA-167	HM488988		
			OXA-168	HM488989		
			OXA-169	HM488990		
			OXA-170	HM488990		
		OXA-171	HM488991			
		OXA-24/33/40	OXA-24/33/40	AJ239129	Bou et al. 2000	
			OXA-25	AF201826	Aftal-Shah et al. 2001	
			OXA-26	AF201827	Aftal-Shah et al. 2001	
			OXA-72	EF534256	Wang et al. 2007	
			OXA-139	AM991978		
			OXA-160	GU199038	Tian et al. 2011	
		OXA-58	OXA-182	HM640278	Kim et al. 2010	
			OXA-58	AY665723	Poirel et al. 2005	
			OXA-96	DQ519090	Koh et al. 2007	
			OXA-97	EF102240	Poirel et al. 2008	
		OXA-143	OXA-164	GU831575	Higgins et al. 2010	
			OXA-143	GQ861437	Higgins et al., 2009	
3a e 3b	B	IMP	OXA-231	JQ676953		
			IMP-1	EF375699	Shibata et al. 2003	
			IMP-2	AJ243491	Riccio et al 2000	
			IMP-4	AF244145	Chu et al. 2001	
			IMP-5	AF290912	Da Silva et al. 2002	
			IMP-6	AB040994	Gales et al. 2006	
			IMP-8	DQ845788	Lee et al. 2008	
			IMP-11	AB074436	Jones et al., 2004	
			IMP-14	GQ302618		
			IMP-19	AB184977	Yamamoto et al. 2011	
			VIM	VIM-1	EF690696	Tsakris et al. 2006
				VIM-2	AF324464	Yum et al. 2002
				VIM-3	AF300454	Lee et al. 2008
				VIM-4	AY135661	Tsakris et al. 2008
				VIM-6	EF645347	
				VIM-11	EF116550	Lu et al. 2008
			SIM	SIM-1		Lee et al. 2005
			SPM	SPM-1	HM370523	Shahcheraghi et al. 2011
			GIM	GIM-1		Mohamed et al. 2011
		NDM	NDM-1	JF836807	Karthikeyan et al. 2010	
			NDM-2	JF703135	Kaase et al. 2011	

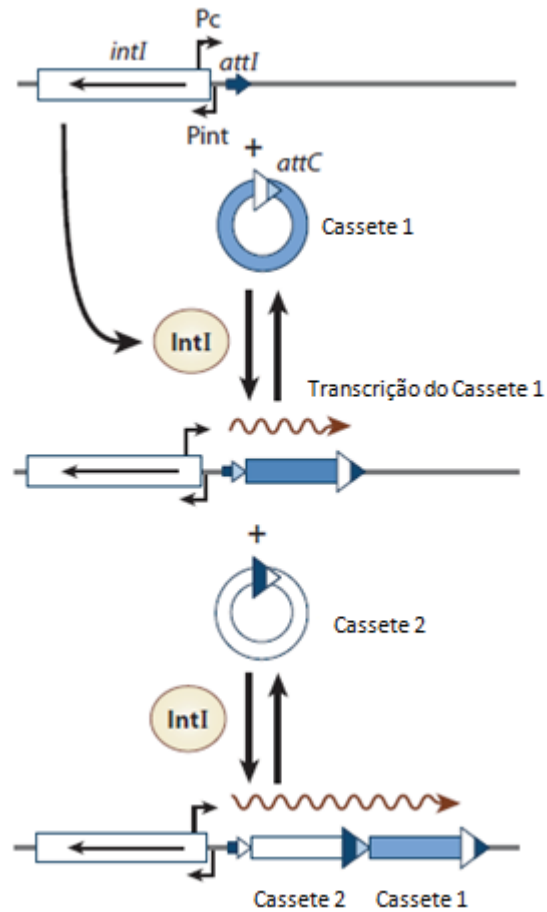


Figura 1. Esquema do processo pelo qual cassetes gênicos são inseridos no sítio *attI* do integron. *IntI* – integrase, *Pc/Pint* – promotores, *attI* – *attachment site* integron, *attC* – *attachment site* cassette. (Adaptado de: Cambray, Guerout, Mazel, 2010)

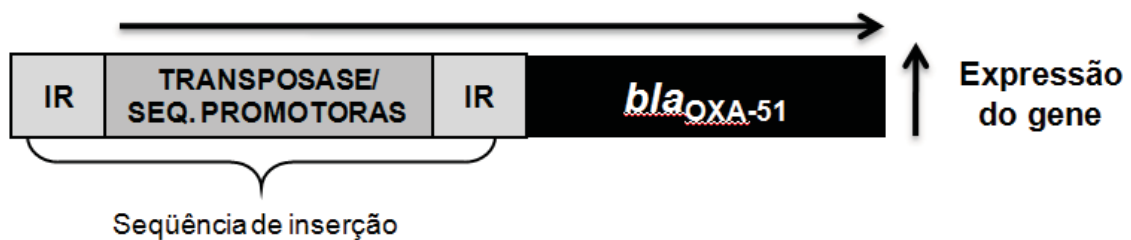


Figura 2. Esquema representando as sequências de inserção localizadas *upstream* aos genes codificadores das CHDLs. IR – sequências repetidas invertidas.

Artigo II

Emergence of *bla*_{OXA-143} gene and dissemination of OXA-23-producing carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in a teaching hospital in Southern Brazil

Artigo em construção

Emergence of *bla*_{OXA-143} gene and dissemination of OXA-23-producing carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in a teaching hospital in Southern Brazil

Bárbara Gionco

Departament of Microbiology Department, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

Floristher Elaine Carrara-Marroni

Departament of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Hospital Universitário de Londrina, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

Emerson José Venancio

Departament of Science Pathological, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

Maria Cristina Bronharo Tognim

Departament of Clinical Analysis, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

Jacinta Sanchez Pelayo

Departament of Microbiology Department, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

Corresponding author: Jacinta Sanchez Pelayo. Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380. CEP 86051-980, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55 43 33715726; e-mail: jspelajo@uel.br

Abstract

This study reports the dissemination of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Hospital Universitário de Londrina (HU) and Ambulatório do Hospital das Clínicas (AHC) – HU/AHC complex located in Londrina, Paraná, Brazil. A total of 91 non-duplicate carbapenem and/or ceftazidime non-susceptible *A. baumannii* strains isolated from August 2006 to July 2009 were evaluated. The Modified Hodge Test (MHT) and the Triple Disk Synergy Test (TDST) were performed to evaluate the production of carbapenemases and metallo-beta-lactamases (MBL), respectively. Polymerase chain reaction (PCR) and amplicon sequencing were performed for the detection of *bla*_{OXA}, *bla*_{MBL} and *bla*_{KPC} genes. The presence of the insertion sequence *ISAbal* relative to *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-51} was assessed by PCR. Isolates were typed by *Enterobacterial repetitive intergenic consensus-based* PCR (ERIC-PCR). A total of 61.2% of the isolates were positive to *bla*_{OXA-23-like} genes and only one isolate presented a *bla*_{OXA-143-like} gene. Genes encoding OXA-24, OXA-58, MBL or KPC were not detected in the isolates studied. In 98.2% isolates, *ISAbal* laid upstream of *bla*_{OXA-23}. *A. baumannii* isolates were separated into 43 clusters, with the highest prevalence of genotype U, and the OXA-23 producing isolates were clustered in 36 genotypes. The high frequency of OXA-23-producing *A. baumannii* in different unrelated clones and the emergency of *bla*_{OXA-143} gene emphasizes the need to control the use of carbapenem and to prevent the spread of these microorganisms in HU/AHC complex.

1. Introduction

Carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) has emerged as one of the most troublesome pathogens for healthcare institutions. Clinical infection due to such organisms pose a serious therapeutic challenge since it is associated with poor patient outcome and death.¹ *A. baumannii* may show resistance to carbapenems through combined mechanisms, including AmpC β -lactamase stable derepression, decreased permeability, altered penicillin-binding-proteins and efflux pump overexpression. Moreover, carbapenem

resistance that is now being reported increasingly in *A. baumannii* clinical isolates has been attributed to the production of carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase (CHDL), class B metallo-beta-lactamase (MBLs), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and GES-carbapenemase.^{2,3}

CHDLs constitute the main group of carbapenemases detected in *A. baumannii* and are classified into five subgroups: OXA-51-like, intrinsic to *A. baumannii* and chromosomally located, and the acquired enzymes namely, OXA-23-like, OXA-24/33/40-like, OXA-58-like and OXA-143. High-level of carbapenem resistance because of the expression of genes encoding CHDLs requires a strong promoter like that provided by the mobile insertion sequence IS*Aba1*.^{4,5}

At Hospital Universitário de Londrina (HU) in Southern Brazil, CRAB began emerging about 1994. Thenceforth, an increasing frequency of this pathogen have been verified, reaching rates of carbapenem resistance higher than national averages: 73% between 2004 to 2007 years.⁶ However, the distribution and characterization of carbapenemases in *A. baumannii* in HU remains to be determined. The aim of this study was to determine the genetic basis of carbapenem-resistance among *A. baumannii* and to assess the molecular epidemiology of this pathogen in our hospital during a three-year period.

2. Materials and Methods

2.1. Hospital setting and bacterial isolates

The Hospital Universitário de Londrina and the Ambulatório do Hospital das Clínicas – HU/AHC complex, includes two teaching hospitals affiliated to Universidade Estadual de Londrina, which constitute a reference medical centre in that region. They provide general and high-complexity medical and diagnostic services and public healthcare for the population residing in the Londrina Metropolitan Region and numerous surrounding cities. The Division of Microbiology of the HU includes two integrated laboratories, that serves both hospitals: the Clinical Microbiology Laboratory (CML) that performs all the routine analysis of clinical specimens and an infection control microbiology

laboratory, involved in performing surveillance of nosocomial pathogens and their antimicrobial resistance attributes.

2.2. Bacterial isolates

Ninety one non-duplicate ceftazidime and/or carbapenem non-susceptible *A. baumannii* strains were evaluated in this study. The isolates were recovered from urine (28), purulent fluids (21), catheter tips (18), blood (18) and other sites (6) of the patients admitted of HU/AHC complex from August 2006 to July 2009 period. Most of isolates were obtained from patients admitted to ICU (36) followed by inpatients on the male ward (19). Bacterial isolates were identified using MicroScan WalkaWay (Sigma, West Sacramento, CA, USA) and the species was confirmed by a polymerase chain reaction (PCR) for the *bla*_{OXA-51} gene, intrinsic to *A. baumannii*.⁷

2.3. Antimicrobial susceptibility tests

The microdilution (using MicroScan WalkaWay) and the agar dilution methods (using Mueller-Hinton agar) were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the following antimicrobials: amikacin, ampicillin/sulbactam, aztreonam, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, meropenem, polymyxin B, sulfamethoxazole/trimethoprim and tigecycline. Results were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.⁸ Since there are no breakpoints approved for tigecycline for *Acinetobacter* spp., the breakpoint for Enterobacteriaceae approved by the Food and Drug Administration (susceptible, ≤ 2 mg/L; resistant ≥ 8 mg/L) were applied to all isolates. Current quality control testing was performed using the following organisms: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25923. All isolates were screened by modified Hodge test (MHT)^{9,10} and the Triple Disk Synergy Test (TDST)¹¹ [EDTA (Sigma, Steinheim, Germany) and 2-mercaptopropionic acid (2-MPA) (Sigma, Steinheim, Germany) to evaluate the carbapenemases and MBL production, respectively.

2.4. PCR amplification and sequencing

Genes encoding OXA-carbapenemases, metallo-beta-lactamases (MBL) – IMP, VIM, SIM, GIM and SPM, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and insertion sequence IS*Aba1* were sought by PCR. To detect genes encoding OXA-carbapenemases and MBL, we performed a multiplex PCR amplification following previously described conditions.^{7,12} A single PCR was performed for detection of *bla*_{OXA-143} and *bla*_{KPC} genes.^{13,14} A PCR using the combinations primers IS*Aba1*-A (5'-GTGCTTTGCGCTCATCATGC-3') and OXA-23 was performed to detect if the insertion sequence was upstream the *bla*_{OXA-23} gene.¹⁵ PCR products were purified using Purelink PCR Purification Kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA).

The sequencing reactions were performed using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analysed by Sequencing Analysis 5.3.1 (Applied Biosystems). Similarity searches and alignments for both the nucleotide sequences were performed with the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.5. Molecular typing

Isolates were typed by *Enterobacterial repetitive intergenic consensus-based* PCR (ERIC-PCR) as previously described.¹⁸ Computer-assisted analyses were interpreted using BioNumerics software, version 6.5 (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium). Comparison of the banding patterns was accomplished by the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) using the Dice similarity coefficient, with arithmetic averages at 2%. Isolates with >80% similarity were assigned as a clone, designated with a capital letter (eg, A, B, C) and the distinct profiles with a number (eg, X1, X2, X3).

3. Results

High rates of resistance to major classes of antimicrobials were observed between the CARB-CAZ-I/R isolates (Table 1): 92.3% ciprofloxacin, 86.6% for

amikacin, 63.3% to gentamicin. Among the beta-lactams the resistance rates obtained were: 92.3% for cefotaxime, 95.6% for ceftazidime and 80.2% for imipenem and meropenem. Only 15.3% strains were susceptible to ampicillin-sulbactam. The antimicrobials that showed most activity against the isolates studied were the polymyxin B (95.6% sensitivity) and tigecycline (100%).

The presence of carbapenemases was detected in 87 (78.6%) *A. baumannii* isolates using the MHT and none positive result was verified for the MBL detection with the TDST. Sixty isolates (61.2%) were positive for the *bla*_{OXA-23} gene, 1 (1.0%) for the *bla*_{OXA-143} and none showed amplification products for *bla*_{OXA-24/40-like}, *bla*_{OXA-58-like}, MBL and KPC genes. The other 16 carbapenemase-positive isolates gave no amplification in PCR suggesting the presence of other carbapenemase genes or false-positive result. A total of 57 isolates carrying the IS*Aba1* upstream the *bla*_{OXA-23} gene were detected. These strains presented MICs for carbapenems ranging for 16-256µg/mL. However, one isolate that not presented this insertion sequence upstream *bla*_{OXA-23} gene exhibited carbapenem susceptibility to imipenem and meropenem with MICs of ≤0.5mg/mL and ≤1mg/mL, respectively.

ERIC PCR identified 22 clusters (named A-V) and 43 distinct profiles (given numbers) (Figure 1). Strains with the *bla*_{OXA-23} gene were polyclonal presenting 35 different profiles. Four major clonal groups (A, B, O and U) were verified each containing at least six isolates. The temporal distribution of these clones in HU indicated that clonal groups A, B, O and U were identified in different wards of HU (UCI, emergency, and male and female wards) and represented 27,5 (25 isolates) of the getotyped isolates. The number of clone A, O and U tended to fluctuated over the study period and the clone B was identified only from November 2008 (Figure 2). The isolate susceptible to carbapenem carrying *bla*_{OXA-23} and the isolate carrying *bla*_{OXA-143} were found in the U and D clones, respectively.

4. Discussion

CRAB reports have increased gradually over last ten years in Europe, North and Latin Americas. The SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program)

revealed that between the years 2006-2009 the overall resistance to imipenem in *Acinetobacter* spp. was approximately 56.0% and in Latin America the rate was 48.3%.¹⁷ OXA-23 enzyme was first detected in Scotland in 1985 even before the use of imipenem in that hospital. Since then, OXA-23-producing *A. baumannii* were reported in diverse geographic areas. OXA-23 is also the CHDL most widespread in Brazil, after the first report of CRAB carrying OXA-23 in Curitiba, OXA-23-producing *A. baumannii* were also detected in Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul and in our hospital located in the north of Paraná state.¹⁸⁻²²

Between the years 2004-2007, the rate of carbapenem resistance was 73% in HU/AHC complex.⁶ Among the isolates selected for study 80.2% were resistant to carbapenems, this rate was higher when compared with the resistance among the OXA-carbapenemase-producing isolates, 98.4%. Isolates that do not produce OXA-23 have resistance rates to carbapenems lower compared to the OXA-23-producing *A. baumannii*, indicating that production of OXA-carbapenemases can contribute to increase the resistance to carbapenems in our institution.

As the high rate of CRAB has been observed on a global scale, the few remaining therapeutic options include tigecycline and polymyxins, despite previous withdrawal because of reports nephrotoxicity and neurotoxicity presented. However, in the last few years a large number of reports have demonstrated that these agents seem to be efficacious and safe for treatment of infections with multidrug-resistant *A. baumannii*.^{2,23,24} Although the tigecycline and the polymyxin B demonstrated, *in vitro*, to be the most active against *A. baumannii* studied, four strains presented decreased sensibility for polymyxin B (MICs range 4-16µg/mL). The emergence of *A. baumannii* resistant to all available antibiotics, except to tigecycline, or pan-resistant *A. baumannii*, is considered an alarming occurrence.²

The IS*Aba1* element have been detected upstream of the *bla*_{OXA-23} gene in *A. baumannii* strains with truly resistance to carbapenems and perform an important role in the expression of this gene.⁵ Recently, Carvalho et al. (2011) described carbapenem-susceptible *A. baumannii* strains carrying the *bla*_{OXA-23}-like gene and related that the permanence of an isolated carbapenem-

susceptible carrying the *bla*_{OXA-23} can be explained by the absence of the element *ISAbal1* upstream of this gene. This finding is very worrisome since carbapenem-susceptible OXA-producers may be functioning as reservoirs of such resistance determinant with potential risk for silent spread. In addition, failing in detecting OXA production among carbapenem-susceptible isolates may lead to inadequate prescription of carbapenems and possible therapeutic failure in seriously ill patients.²⁵

The *bla*_{OXA-143} gene was first detected in 2009 in Brazil, and even then the reports are restricted to our country, with prevalence in the Southeast region of this country.¹³ Our study reports the first isolation of *A. baumannii* carrying the *bla*_{OXA-143} gene in the South of Brazil, showing the emergence of this gene in other regions of the country.

Previous studies, including Brazilian reports of *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* outbreaks have generally described them as clonal. Localized expansions of successful clones are to be expected, but in most of these studies, isolates were collected over a limited period.²⁶⁻²⁸ Presence of the *bla*_{OXA-23} gene in multiple distantly related *A. baumannii* suggests that its widespread nature cannot be assigned to the spread of a dominant clone but rather to the dissemination of multiple carbapenem-resistant lineages and it is conceivable that various clones occur often in a setting where the pathogen is endemic.²⁹ A comparative study by Viana et al. (2011) found that the distribution of CRAB in our hospital is multiclonal, also the several multidrug-resistant clones can coexist endemically for several years.

In 2007, after detecting high levels of vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in HU, a study performed by Perugini et al. (2007) established an intervention measures to raise awareness of hospital staff in order to reduce the incidence of multiresistant bacteria. The intervention took place in April 2007, with theoretical and practical lessons to approximately 136 persons working in ICUs, emphasizing the importance of adherence to control measures for prevention, hand hygiene, cleaning and disinfection of equipment, furniture and surfaces.³⁰ When the distribution of the major clusters of *A. baumannii* was analyzed for the May 2007 to July 2008 period, a significant decrease in the incidence of *A. baumannii* is verified too. Only two clones (A and O) were

detected in the period of August to October 2007, O being the most susceptible cluster among the representative clone (Figure 2). These results show that the training of hospital staff can be reduce the number of multidrug-resistant clones and the incidence of infection of this pathogen.⁵¹

Conclusions

In conclusion, the presence of *bla*_{OXA-23} gene in 36 different clones from different wards at different times indicates the mobility of this gene within our isolates contributing to the high rates of imipenem resistance among the *A. baumannii* studied. The widespread nature of the *bla*_{OXA-23} gene as well as the emergence of the *bla*_{OXA143} gene in one isolate are a cause of great concern and show the potential of these CHDLs determinants spread in our regional hospital. As such, standard infection control precautions targeting CRAB transmission should be stringently adhered in order to reduce the risk of such resistance genes, staff should be educated on the procedures, and surveillance studies should be constantly conducted to measure infection. Moreover, judicious use of carbapenems must be advocated, as widespread use of such agents also creates an environment favoring the inter-species transfer as the overt expression of the CHDL genes.

Aknowledgements

The authors would like to thank Prof. Dr. Ana Cristina Gales and Dr. Rodrigo Cayô Silva for your generous helpful assistance and discussion in the development of design and performance of experiments. We thank to Laboratório ALERTA for providing the standards strains.

This work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Durante-Mangoni E, Zarrilli R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. *Future Microbiol.* 2011; 6:407-422.
2. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2010; 8:71-93
3. Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Couvarlin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2009; 53:3579-3581.
4. Esterly J, Richardson CL, Eltoukhy NS, Qi C, Scheetz MH. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Ann. Pharmacother.* 2011; 45.
5. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54:24-38.
6. Viana GF, Dos Santos Saafeld SM, Garcia LB, Cardoso CL, Pelisson M, Tognim, MCB. Evolution of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital. *Appl. Microbiol.* 2011, 53: 374-378.
7. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006; 27: 351–3.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing — Ed:22. Approved Standard M100-S22.* CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.
9. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH et al. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:4623-4629.
10. Lee K, Kim CK, Yong D, Jeong SH et al. Improved performance of the modified Hodge teste with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J. Microbiol. Methods.* 2010; 83:149-152.
11. Picão RC, Soraya SA, Nicoletti AG, Campana EH et al. Metallo- β -lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 2028-2037.
12. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodfor N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 59:321-322.
13. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53:5035-5038.
14. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visali M et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39:55-60.

15. Poirel L, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2006; 50: 1442-1448.
16. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 1991; 24:6823-6831.
17. Gales AC, Jones, RN, Sader, HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66: 2070-2074.
18. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:3403-3406.
19. Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G, Santos LC et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009; 34:25-28.
20. Mostachio AK, van der Heidjen I, Rossi F, Levin AS et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58:1522-1524.
21. Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in southern Brazil. *Infection* 2009; 37:474-476.
22. Carneiro MC, Barbosa PIPL, Vespero EC, Tanita MT et al. Carbapenem-resistant OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates causing ventilator-associated pneumonia. *Am. J. Infect. Control* 2010; 38:667-669.
23. Tuon FF, Rymsza AM, Penteado-Filho SR, Pilonetto M et al. Should polymyxin be used empirically to treat infections in patients under high risk for carbapenem-resistant *Acinetobacter*? *J. Infect.* 2011; 62:246-249.
24. Balaji V, Jeremiah SS, Baliga PR. Polymyxins: antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. *India J. Med. Microbiol.* 2011; 29: 230-242.
25. Carvalho KR, Carvalho-Assef APD, Santos LG, Pereira MJF et al. Occurrence of *bla*_{OXA-23} gene in imipenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011; 106:505-506.
26. He C, Xie Y, Fan H, Kang M et al. Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of European clone II in Western China. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2011; 38:257-260.
27. Chu YW, Cheung TKM, Chu MY, Lo JTC et al. OXA-23-type imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in Hong Kong. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009; 34:285-286. Andriamanantena TS, Ratsima E, Rakotonirina HC, Randrianirina F et al. Dissemination of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospitals of Antananarivo Madagascar. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2010; 30:9-17.
28. Kuo HY, Yang CM, Lin MF, Cheng WL et al. Distribution of *bla*_{OXA}-carrying imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in 3 hospitals in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 66:195-199.

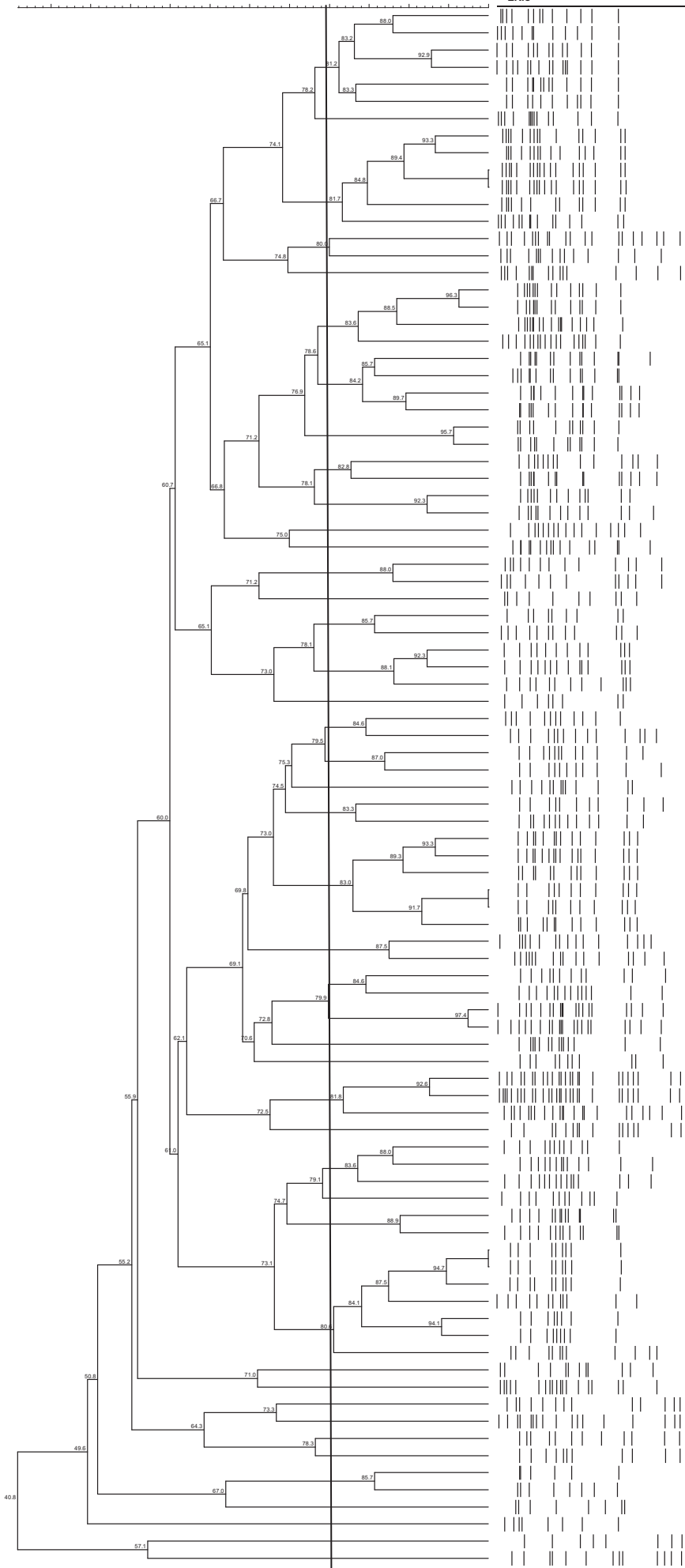
29. Marchaim D, Navon-Venezia S, Leavitt A, Chmelnitsky I et al. Molecular and epidemiologic study of polyclonal outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a Israeli Hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2007; 28:945-950.
30. Perugini, MRE. Avaliação do impacto de medidas de intervenção no controle de *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina em unidade de terapia intensiva. Tese de Doutorado. 2008.

Table 1. Susceptibility patterns of 91 *A. baumannii* isolates and the OXA-23-positive to 12 antimicrobial agents.

Antimicrobial	Sensitivity profile (%)					
	S			R		
	Total isolates	OXA-23-positive	OXA-23-negative	Total Isolates	OXA-23-positive	OXA-23-negative
Amikacin	10,0	6,8	5,5	86,6	89,8	27,5
Ampicillin/Sulbactam	15,3	3,3	13,1	59,3	71,6	20,8
Aztreonam	5,2	-	1,1	78,9	100	6,6
Cefotaxime	4,4	3,3	2,1	92,3	96,7	28,5
Ceftazidime	3,3	3,3	1,1	95,6	96,7	30,7
Ciprofloxacin	6,6	3,3	4,4	92,3	96,7	28,5
Gentamicin	18,8	18,6	6,6	63,3	67,7	18,6
Imipenem	18,7	1,6	16,5	80,2	98,4	16,5
Meropenem	19,8	1,6	17,6	80,2	98,4	16,5
Polymyxin B	95,6	95,0	1,1	4,4	5,0	32,9
Sulphametoxazole/trimetoprim	26,4	28,3	7,7	73,3	71,7	26,4
Tigecycline	100	100	100	-	-	-

	Total isolates		OXA-23-positive		OXA-23-negative	
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Imipenem	32	64	32	64	8	32
Meropenem	32	64	32	64	4	32
Ceftazidime	128	>128	>128	>128	128	>128
Ampicillin/Sulbactam	32/16	64/32	32/16	64/32	16/8	128/64
Polymyxin B	2	2	2	2	1	2
Tigecycline	1	1	1	1	1	1

S, susceptible; I, intermediate; R, resistant; MIC_{50/90}, minimum inhibitory concentration for 50% and 90% of the organisms, respectively.



Ac124	F	Plastic	Urine	2008	OXA-23
Ac114	F	ICU	Blood	2007	-
Ac133*	H	Plastic	Urine	2008	-
Ac134	FH	ICU	Urine	2008	OXA-23
Ac129	FF	ICU	Catheter	2008	OXA-23
Ac130	F	ICU	Catheter	2008	OXA-23
Ac168	G	ICU	Catheter	2009	OXA-23
Ac142	I	Male Ward	Urine	2008	OXA-23
Ac146*	I	Emergency	Secretion	2009	-
Ac138	I	ICU	Secretion	2008	OXA-23
Ac139	I	Male Ward	Traqueal Secretion	2008	OXA-23
Ac144	I	ICU	LCR	2008	OXA-23
Ac171	I	ICU	Urine	2009	OXA-23
Ac121	J	Female Ward	Catheter	2008	OXA-23
Ac159	J	Male Ward	Liquid	2009	OXA-23
Ac150	K	Male Ward	Catheter	2009	OXA-23
Ac8	P	Female Ward	Secretion	2006	OXA-23
Ac9	P	ICU	Catheter	2006	OXA-23
Ac98	P	Emergency	Secretion	2007	OXA-23
Ac141	I	Emergency	Urine	2008	OXA-143
Ac69	PP	Male Ward	Catheter	2007	-
Ac71	wP	ICU	Secretion	2007	OXA-23
Ac52*	WP	Female Ward	Urine	2006	-
Ac54	WP	Female Ward	Blood	2007	-
Ac60	WQ	ICU	Urine	2007	-
Ac70*	Q	Male Ward	Blood	2007	-
Ac170	N	Male Ward	Urine	2009	OXA-23
Ac51	N	AHC	Urine	2006	OXA-23
Ac22	O	Male Ward	Catheter	2006	OXA-23
Ac35	O	ICU	Blood	2006	OXA-23
Ac161	L	Clinical	Blood	2009	OXA-23
Ac66*	M	ICU	Secretion	2006	-
Ac151	A	Emergency	Urine	2009	OXA-23
Ac153	A	ICU	Urine	2009	OXA-23
Ac149	B	ICU	Catheter	2009	OXA-23
Ac128	C	ICU	Catheter	2008	OXA-23
Ac147	C	Clinical	Blood	2009	-
Ac20*	D	AHC	Urine	2006	-
Ac24	D	ICU	Secretion	2006	OXA-23
Ac76	D	Male Ward	Blood	2007	-
Ac169	E	Emergency	Blood	2009	OXA-23
Ac140*	R	ICU	Secretion	2008	-
Ac167	R	ICU	Catheter	2009	OXA-23
Ac162	S	Male Ward	Urine	2009	OXA-23
Ac166	S	Emergency	Catheter	2009	OXA-23
Ac91	U	Emergency	Blood	2007	OXA-23
Ac164	V	ICU	Urine	2009	OXA-23
Ac165	V	ICU	Urine	2009	OXA-23
Ac113*	X	Male Ward	Catheter	2007	-
Ac122*	X	Male Ward	Blood	2008	-
Ac48	X	Male Ward	Peritoneal Liquid	2006	OXA-23
Ac127*	X	Female Ward	Urine	2008	-
Ac160*	X	Clinical	Peritoneal Liquid	2009	-
Ac88	X	Female Ward	Secretion	2007	-
Ac163	Z	ICU	Secretion	2009	OXA-23
Ac89	Z	Emergency	Liquid	2007	OXA-23
Ac83	Y	ICU	Blood	2007	-
Ac85	Y	Clinical	Blood	2007	OXA-23
Ac92	W	Male Ward	Catheter	2007	OXA-23
Ac94	YW	Clinical	Catheter	2007	OXA-23
Ac86	YB1	Male Ward	Secretion	2007	OXA-23
Ac84	A1	Emergency	Blood	2007	OXA-23
Ac118	K1	ICU	Urine	2008	-
Ac119	K1	Emergency	Urine	2008	-
Ac87	K1	ICU	Secretion	2007	OXA-23
Ac116	L1	Emergency	Urine	2008	-
Ac15	E1	Male Ward	Urine	2006	OXA-23
Ac36	E1	ICU	Blood	2006	OXA-23
Ac39	E1	ICU	Catheter	2006	OXA-23
Ac73*	F1	AHC	Urine	2007	-
Ac59*	G1	Emergency	Urine	2007	-
Ac61	G1	ICU	Secretion	2006	OXA-23
Ac10	H1	ICU	Secretion	2006	OXA-23
Ac11	H1	Female Ward	Urine	2006	OXA-23
Ac5	H1	ICU	Secretion	2006	OXA-23
Ac148	H1	ICU	Secretion	2009	OXA-23
Ac56	H1	Male Ward	Secretion	2007	-
Ac57*	H1	Clinical	Catheter	2007	-
Ac154	H1	ICU	Blood	2009	OXA-23
Ac32	M1	ICU	Secretion	2006	OXA-23
Ac156	N1	ICU	Catheter	2009	OXA-23
Ac78*	I1	Emergency	Blood	2008	-
Ac82*	J1	AHC	Secretion	2007	-
Ac77	C1	ICU	Blood	2007	OXA-23
Ac79	D1	Female Ward	Liquid	2007	OXA-23
Ac50	O1	Male Ward	Urine	2006	-
Ac72	O1	Male Ward	Urine	2007	-
Ac18	P1	Emergency	Urine	2006	-
Ac172	Q1	ICU	Urine	2009	OXA-23
Ac111	R1	ICU	Blood	2008	OXA-23
Ac115	S1	Emergency	Blood	2007	OXA-23

Figure 1. ERIC profiles of *Acinetobacter baumannii* isolates for the August 2006 to July 2009 period. The line in the dendrogram denotes the threshold of 80% homology for defining groups of genetic similarity. The capital letters indicate the major clusters obtained.
*Susceptible to carbapenems.

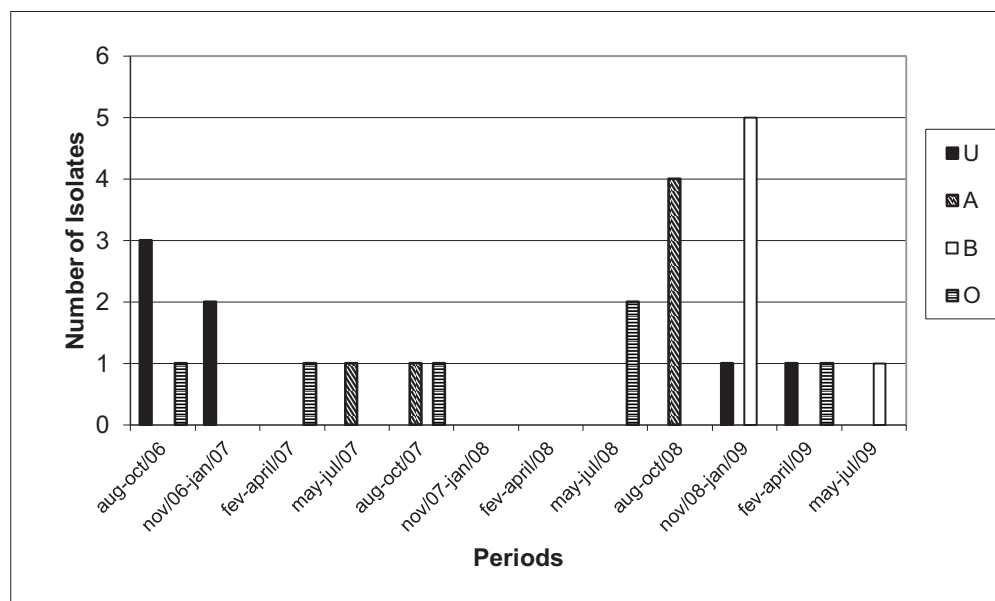


Figure 2. Temporal distribution of main four *A. baumannii* clusters verified in HU. Clusters: A, B, O and U.

Artigo III

Detection of OXA-231, a new variant of *bla*_{OXA-143}, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report

Artigo enviado ao periódico **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** na forma de *Brief report*

Detection of OXA-231, a new variant of *bla*_{OXA-143}, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report

Bárbara Gionco^{1*}, Jacinta S. Pelayo¹, Emerson J. Venancio², Rodrigo Cayô³, Ana C. Gales³, Floristher E. Carrara-Marroni⁴.

¹Department of Microbiology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

²Department of Science Pathological, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

³Laboratório ALERTA, Division of Infectious Diseases, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis, Hospital Universitário de Londrina, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

Keywords: carbapenems, oxa-type beta-lactamase, polymyxin B, drug resistance

***Corresponding author.** Current Address: Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380. CEP 86051-980, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55 43 33715726; e-mail: barbara_gionco@hotmail.com

Sir,

In Brazil, the resistance rates to carbapenem range from 25% to 45% among *A. baumannii* isolates.¹ The mechanisms of carbapenem resistance among these isolates are mainly associated with the production of two major carbapenem-hydrolysing class D carbapenemases (CHDL), OXA-23 and OXA-143.^{2,3} To date, OXA-143 is the single representative of this recently reported subgroup of CHDL. In contrast to the OXA-23 subgroup, which is widely disseminated in the Brazilian territory, OXA-143 has been only detected in *A. baumannii* isolated from hospitals located in São Paulo and Rio de Janeiro states so far.²⁻⁵ Analysis of the genetic environment of *bla*_{OXA-143} revealed that it was bracketed by two copies of the same replicase gene. It suggests that a homologous recombination process probably took part in the *bla*_{OXA-143} acquisition.⁴ This study reports the occurrence of OXA-231, a novel variant of OXA-143, in an *A. baumannii* clinical isolate (AC-141 strain) recovered from a tertiary teaching hospital located in Southern Brazil.

In October 2007, a 72-year-old woman was admitted at the emergency room of the Hospital Universitário de Londrina (HU), a teaching hospital located in the city of Londrina, state of Paraná, Brazil. The patient presented history of diabetes, hypertension and had previously been submitted to a transtibial amputation due an infected diabetic foot, at the HU, 25 days ago. On the day of admission, the patient presented fever, dyspnea and was diagnosed with pneumonia. Empirical therapy with cefepime [2 g, intravenously (iv), twice daily] and vancomycin [1.5 g, iv, once a day] was started. Five days after hospitalization, the patient got febrile and showed signals and symptoms of urinary tract infection. An ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* susceptible only to imipenem and amikacin was isolated from urine. Therapy with imipenem [500 mg, iv, four times a day] was initiated. Six days after imipenem administration, the patient remained febrile and developed signals of sepsis. A carbapenem-resistant *A. baumannii* isolate (Ac-141 strain) was recovered from the urine culture and antimicrobial therapy was replaced by polymyxin B [500.000 UI, iv, three-times a day] that was continued for ten days. The patient showed clinical improvement and was discharged after 15 days of

hospitalization. The next urinary cultures were negative indicating that microbiological cure as achieved.

The AC-141 strain was initially identified at species level by MicroScan-Walk-Away automated system (Siemens Healthcare Diagnostic) and reidentified by 16S rRNA gene sequencing. The minimal inhibitory concentrations (MIC) for ceftazidime, imipenem, meropenem, ampicillin-sulbactam and polymyxin B were confirmed by agar dilution method, according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Institute (CLSI).⁷ According to susceptibility tests results, the Ac-141 strain was resistant to ampicillin/sulbactam (MIC, >128/64 mg/L), ticarcillin/clavulanic acid (MIC, >64/2 mg/L), cefotaxime (MIC, >32 mg/L), ceftazidime (MIC, >128 mg/L), cefepime (MIC, >16 mg/L), imipenem (MIC, 64 mg/L), meropenem (MIC, 64 mg/L), trimethoprim/sulfamethoxazole (MIC, >2/38 mg/L), amikacin (MIC, >4 mg/L), ciprofloxacin (MIC, >4 mg/L), levofloxacin (MIC, >4 mg/L), gentamicin (MIC, >8 mg/L), tobramycin (MIC, >8 mg/L) but susceptible only to polymyxin B (MIC, 1 mg/L). AC-141 also showed low tigecycline MIC (1 mg/L).

PCR targeting genes encoding CHDLs, metallo- β -lactamases (M β L) and KPC, were carried out as previously described.^{7,8} The PCR results showed that the Ac-141 strain carried the *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-143} genes. A subsequent PCR targeting both *bla*_{OXA-51} and the insertion sequence ISAb₁ yielded a positive result. DNA sequencing of the *bla*_{OXA-143} amplicon, using the primers OXA143-F (5'-AGTTAACTTTCAATAATTG-3'), OXA143-R (5'-TTGGAAAATTATATAATCCC-3'), identified a single mutation at position 671 that led to an amino acid substitution (Asp224→Ala) as shown in Figure 1. This new OXA-143 variant was named OXA-231 and its nucleotide sequence has been deposited in the GeneBank under the accession number JQ676953.

In our hospital, 75% of the *A. baumannii* isolates are resistant to carbapenems. The production of OXA-23 has been the main mechanism of carbapenem resistance found in these isolates. For instance, from August 2006 to August 2011, *bla*_{OXA-23} was detected in 68% of *A. baumannii* isolates that belonged to multiple clones (unpublished data). To our knowledge, this is the first description of OXA-143 cluster in an *A. baumannii* strain isolated in our hospital and in southern Brazil, and coincidentally it is a novel variant of this

cluster. Curiously, no additional OXA-143 or OXA-231-producing *A. baumannii* isolates have been detected in our hospital. It might suggest that AC-141 was recently introduced in our hospital and its spread controlled.

The detection of OXA-231 in Brazil is a cause of great concern and shows the potential of these new CHDL spread to other Brazilian regions. Although, only a single case involving OXA-231 was reported, continuous surveillance studies are of paramount importance to prevent its further dissemination. Lastly, we would like to emphasize the clinical and microbiological efficacy of polymyxin B in eradicating the infection caused by AC-141 strain. The clinical success probably was achieved because the urinary tract was the source of infection. Unfortunately, a distinct outcome could have observed if the respiratory tract was infected. In this manner, novel therapeutic agents are extremely necessary for treatment of multi-drug resistant Gram-negative bacilli.

Funding

Not to declare.

Transparency declarations

A. C. G. has received research funding and/or consultation fees from Janssen-Cilag, Wyeth/Pfizer, Novartis and Sanofi-Aventis. Other authors have nothing to declare.

References

1. Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis* 2011; **52**: 1138-43.
2. Werneck JS, Picão RC, Girardello R *et al*. Low prevalence of *bla*_{OXA-143} in private hospitals in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4494-5.
3. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA *et al*. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; **41**:3403-6.
4. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M *et al*. OXA-143, a novel carbapenem hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 5035-8.
5. Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G *et al*. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **34**: 25-8.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically- Eighth Edition: Approved Standard M07-A8. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
7. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM *et al*. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **27**: 351-3.
8. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM *et al*. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2007; **59**:321-322.

CONCLUSÕES

1. Altas taxas de resistência aos carbapenêmicos foram obtidas para as cepas de *Acinetobacter baumannii* isoladas no complexo HU/AHC no período do estudo, entretanto altas taxas de sensibilidade foram obtidas para polimixina B e tigeciclina, sugerindo que estes antimicrobianos constituem opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* multiresistentes.
2. Os maiores valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ obtidos para os isolados portadores do gene *bla*_{OXA-23}, quando comparados com os isolados não carreadores desse gene, enfatizam a importância deste mecanismo na manutenção da resistência aos carbapenêmicos entre os isolados de *A. baumannii* no complexo HU/AHC.
3. A disseminação generalizada de *A. baumannii* multiresistentes portadores do gene *bla*_{OXA-23} e a emergência do gene *bla*_{OXA-143} em um isolado no complexo HU/AHC constituem causa de grande preocupação e demonstram o potencial de disseminação dos genes codificadores de CHDLs em nosso hospital.
4. A identificação de um isolado de *A. baumannii* fenotipicamente sensível aos carbapenêmicos portador do gene *bla*_{OXA-23} revela que esse microrganismo pode funcionar como um reservatório genético deste gene facilitando a disseminação silenciosa do mesmo.
5. A disseminação clonal dos isolados portadores do gene *bla*_{OXA-23} em diferentes alas hospitalares e em diferentes períodos indica a mobilidade deste gene entre os isolados *A. baumannii* no complexo HU/AHC.