

ANDREA DOS SANTOS PEREIRA

**Determinação da Concentração de Antimicrobiano Capaz de
Prevenir o Aparecimento de Mutantes Resistentes em Amostras
Clínicas de *Acinetobacter* spp.**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para Obtenção do Título de
Doutora em Ciências**

São Paulo

2009

ANDREA DOS SANTOS PEREIRA

**Determinação da Concentração de Antimicrobiano Capaz de
Prevenir o Aparecimento de Mutantes Resistentes em Amostras
Clínicas de *Acinetobacter* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para Obtenção do Título de
Doutora em Ciências

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Gales**

Este trabalho foi realizado com auxílio
financeiro da Fundação de Amparo a
Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP: 04/14434-3)

**São Paulo
2009**

PEREIRA, Andrea dos Santos

Determinação da Concentração de Antimicrobiano Capaz de Prevenir o Aparecimento de Mutantes Resistentes em Amostras Clínicas de *Acinetobacter* spp. / Andrea dos Santos Pereira /. - São Paulo, 2009.xvii, 171f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia

Título em inglês: Evaluation of the mutant prevention concentration for many antimicrobial agents against *Acinetobacter* spp.

Palavras-chaves: 1. *Acinetobacter* spp., 2. MPC, 3. Resistência bacteriana, 4. Efluxo, 5. Porina

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA**

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Coordenador do curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

São Paulo

2009

iii

ANDREA DOS SANTOS PEREIRA

**Determinação da Concentração de Antimicrobiano Capaz de Prevenir
o Aparecimento de Mutantes Resistentes em Amostras Clínicas de
Acinetobacter spp.**

Presidente da banca: Prf^a. Dr^a. Ana Cristina Gales

BANCA EXAMINADORA

Titular: Prof^a Dr^a. Anna Sara Shafferman Levin

Titular: Prof. Dr. Carlos Emilio Levy

Titular: Prof^a. Dr^a. Libera Maria Dalla Costa

Titular: Prof. Dr. Sergio Barsanti Wey

Suplente: Prof^a Dr^a Ângela Maria da Silva

Suplente: Prof^a Dr^a Silvia Figueiredo Costa

Aprovada em: ____/____/____

*“Ando devagar, porque já tive pressa,
Levo este sorriso, porque já chorei demais...
Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe?
Só levo a certeza de que muito pouco sei,
ou nada sei...”*
Almir Sater

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe Ana Maria e ao meu pai José Luiz pelo apoio incondicional e pelo exemplo de dedicação e determinação... Por me ensinar que a vida é simplesmente amar, e que sempre no final tudo dará certo!

E sem dúvida, este trabalho é dedicado, ao meu amor, cúmplice e companheiro Alexandre, por se privar de muitos momentos para que conseguisse chegar até aqui, além de me dar o maior presente da minha vida, meu filho que esta chegando...

AGRADECIMENTOS

A DEUS primeiramente, por ser a minha fortaleza o meu maior ponto de equilíbrio. Por ser a base de tudo que sou e acredito na vida!!!

À Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Gales pelos ensinamentos e pela paciência a mim direcionada e também pôr me conceder o privilégio da sua orientação. Ana, muito obrigada pela doçura e delicadeza, não apenas durante as correções deste trabalho, mas por todos esses anos de convívio.

Ao Prof^o Dr^o Antônio Carlos Campos Pignatari, meu respeito e admiração pelos valiosos ensinamentos durante o convívio diário no LEMC. Pelo exemplo de generosidade como pessoa e como profissional. Professor muito obrigada por me receber no LEMC e por todas oportunidade que me foi acreditada!

Ao Prof^o Dr^o Hélio Silva Sader por ter aberto as portas do LEMC para eu iniciar a minha carreira científica com muito talento e profissionalismo.

À Jussimara Monteiro pela amizade, apoio e incentivos que foram decisivos durante a realização deste trabalho. LEMC. Obrigada por todo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida!!!

À Liana Carballo Menezes pelo apoio e ensinamentos que foram fundamentais na realização deste trabalho. Obrigada pela ajuda durante a realização e análise dos experimento e pela imensa paciência em elucidar inumeras duvidas sobre PCR em tempo real.

À amiga Kelly Aline Santiago, por todo o auxílio durante a realização da MPC desta tese, sem o teu apoio seria muito mais difícil.

Ao Rodrigo Cayô pela amizade, pelo incentivo, pelos conselhos, e acima de tudo por todo auxílio durante a realização durante e execução e análise das proteínas de membrana externa e por participar tão ativamente deste trabalho.

À Adriana Nicoletti, em primeiro lugar pelo exemplo de delicadeza e competência durante o grande auxílio durante a execução deste trabalho, participando ativamente da detecção de mutações nas regiões determinantes de resistência às quinolonas, meu muito obrigada!

À Rosana Capecce pela amizade, carinho e convivência diária. Obrigada por tudo que fez e tem feito por mim, sem você para resolver todos os imprevistos que ocorreram até aqui eu jamais teria conseguido.

Aos pós graduandos Renata Picão, Paula Barbosa, Fernanda Inoue, Fernanda Marques, Anderson Fernandes, Paulo José, Martha Rivero, Thaís Avila pela convivência, amizade e apoio durante todos esses anos de convívio diário.

Aos Danilo Elias pelos grandes ensinamentos durante a realização da PCR em tempo real e pela amizade.

Às pós-graduandas Itacy Silva e Juliana Gugel por todo esforço dedicado durante a padronização da técnica da MPC no LEMC.

À amiga Soraya Sgambatti de Andrade pelo trabalho em conjunto, pelo carinho e por sempre estar a disposição para me ajudar.

Ao meu irmão Marcelo pelo carinho e por ser o meu melhor amigo e companheiro inseparável. Seu otimismo e alto astral impulsionaram-me sempre. A sua amizade torna a aventura de viver muito mais interessante e prazerosa!!!

Aos amigos do Hospital Municipal do M'Boi Mirim principalmente a Eliane Camargo, Karina Simplicio, Fabiana Cavaleira e Fernanda Fernandes por todo apoio e compreensão durante a fase final deste trabalho.

As todas as pessoas que participaram diretamente ou indiretamente do meu trabalho, o meu muito obrigada!

Índice de Siglas e Abreviações

NNIS – *National Nosocomial Infection Surveillance System*

FDA – *Food and Drug Administration*

QRDR – Regiões determinantes de resistência às quinolonas

UTI – Unidade de terapia Intensiva

ESBLs – *Extended spectrum β -lactamases*

OMP – *Outer membrane protein*

PBPs – *Penicilin binding proteins*

M β Ls – Metalo- β -lactamases

UFC – Unidades formadoras de colônia

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

MIC – Concentração inibitória mínima

MPC – Concentração de antimicrobiano que previne o surgimento de bactérias mutantes

MSW – *Mutant selection window*

JSM – Janela para seleção de mutantes

IS – *Insertion sequence*

E– Eficiência

Ct – Ciclo de detecção de fluorescência em relação ao threshold

Δ ct – Diferença entre o Ct da amostra e o ct do endógeno (16s RNA)

$\Delta\Delta$ ct – Diferença entre o Ct da amostra e o ct do calibrador (amostra selvagem)

EN – Expressão normalizada

qRT-PCR – Quantificação da transcriptase reversa reação da polimerase em cadeia

QR – Quantificação relativa

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação funcional e molecular das β -lactamases bacterianas	12
Tabela 2. Atividade dos sistemas de bomba de efluxo descritos em <i>A. baumannii</i> .	23
Tabela 3 – Range das concentrações de antimicrobianos testadas para os isolados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp.	37
Tabela 4. Concentrações dos antimicrobianos testados para determinação das MPCs.	39
Tabela 5. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizado para quantificação da expressão gênica pela técnica da qRT-PCR.	50
Tabela 6. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos pela técnica de ágar diluição das amostras de <i>Acinetobacter</i> spp.	55
Tabela 7. Determinação das MIC ₅₀ e MIC ₉₀ para os diversos antimicrobianos pela técnica de ágar diluição das amostras de <i>Acinetobacter</i> spp. de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI 2006b).	56
Tabela 8. Avaliação da MPC dos diversos agentes antimicrobianos para as amostras de <i>Acinetobacter</i> spp	58
Tabela 9. Determinação das MPC ₅₀ e MPC ₉₀ para os diversos antimicrobianos das amostras de <i>Acinetobacter</i> spp.	59
Tabela 10. Determinação da janela para seleção de mutantes resistentes dos diversos agentes antimicrobianos entre as amostras clínicas de <i>Acinetobacter</i> spp.	61
Tabela 11. Correlação entre MIC e MPC para diversos antimicrobianos testados entre os isolados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp	62

Tabela 12. Amostras selecionadas para detecção dos diferentes mecanismos de resistência.	63
Tabela 13. Amostras selecionadas para detecção dos diferentes mecanismos de resistência	64
Tabela 14.. Caracterização dos mecanismos de resistência ao β -lactâmicos para isolados clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp.	66
Tabela 15.. Caracterização dos mecanismos de resistência à polimixina B entre as amostras de <i>Acinetobacter</i> spp.	70
Tabela 16. Detecção da mutação nos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i> em isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. testadas contra fluoroquinolonas.	71
Tabela 17. Amostras de <i>Acinetobacter</i> spp. selecionadas para análise da transcrição gênica pela técnica da qRT-PCR para avaliação de diversos mecanismo de resistência.	74

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema representativo das principais famílias de sistema de efluxo localizado na membrana de bactérias Gram-negativas.	22
Figura 2. Ilustração esquemática da seleção de subpopulações mutantes resistentes.	27
Figura 3. Perfil farmacocinético hipotético demonstrando que a janela para seleção de mutantes fica localizada entre a MIC e MPC. (Adaptado do artigo do Drlica, 2003)	30
Figura 4 – Gel dos padrões de proteínas de membrana externa de <i>Acinetobacter</i> spp. avaliados para ceftazidima	69
Figura 5. Quantificação relativa da expressão de β -lactamase do tipo AmpC para amostra 30078 de <i>Acinetobacter</i> spp.	77
Figura 6. Quantificação relativa da expressão do sistema de bomba de efluxo AdeB para amostra 30078 de <i>Acinetobacter</i> spp.	78
Figura 7. Quantificação relativa da expressão da proteína de membrana externa CarO para amostra 30078 de <i>Acinetobacter</i> spp.	79
Figura 8. Quantificação relativa da expressão da proteína de membrana externa OmpA para amostra 30078 de <i>Acinetobacter</i> spp.	80
Figura 9. Quantificação relativa da expressão da proteína de membrana externa OmpW para amostra 30078 de <i>Acinetobacter</i> spp.	81
Figura 10. Quantificação relativa da expressão de β -lactamase do tipo AmpC para amostra 17066 de <i>Acinetobacter</i> spp.	82
Figura 11. Quantificação relativa da expressão do sistema de bomba de efluxo AdeB para amostra 17066 de <i>Acinetobacter</i> spp.	83
Figura 12. Quantificação relativa da expressão da proteína de membrana	84

externa CarO para amtra 17066 de *Acinetobacter* spp.

Figura 13. Quantificação relativa da expressão da proteína de membrana externa OmpA para amtra 17066 de *Acinetobacter* spp. 85

Figura 14. Quantificação relativa da expressão da proteína de membrana externa OmpW para amtra 17066 de *Acinetobacter* spp. 86

Figura 15. Quantificação relativa da expressão de β -lactamase do tipo AmpC para amostra 58054 de *Acinetobacter* spp. 87

Figura 16. Quantificação relativa da expressão do sistema de bomba de efluxo AdeB para amostra 58054 de *Acinetobacter* spp. 88

Figura 17. Quantificação relativa da expressão da proteína de membrana externa CarO para amotra 58054 de *Acinetobacter* spp. 89

Figura 18. Quantificação relativa da expressão da proteína de membrana externa OmpA para amtrota 58054 de *Acinetobacter* spp. 90

Figura 19. Quantificação relativa da expressão da proteína de membrana externa OmpW para amtrota 58054 de *Acinetobacter* spp. 91

Figura 20. Quantificação relativa da expressão de β -lactamase do tipo AmpC para amostra 146098 de *Acinetobacter* spp. 92

Figura 21. Quantificação relativa da expressão do sistema de bomba de efluxo AdeB para amostra 146098 de *Acinetobacter* spp. 93

Figura 22. Quantificação relativa da expressão da proteína de membrana externa CarO para amtrota 146098 de *Acinetobacter* spp. 94

Figura 23. Quantificação relativa da expressão da proteína de membrana externa OmpA para amtrota 146098 de *Acinetobacter* spp. 95

Figura 24. Quantificação relativa da expressão da proteína de membrana externa OmpW para amtrota 58054 de *Acinetobacter* spp. 96

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. AGENTE ETIOLÓGICO	3
2.2. INFECÇÕES CAUSADAS POR ACINETOBACTER SPP.	5
2.3. RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE ACINETOBACTER SPP.	7
2.3.1. <i>Alteração do sítio de ação dos antimicrobianos</i>	8
2.3.2. <i>Produção de β-lactamases</i>	10
2.3.2.2 <i>β-lactamase de Espectro Ampliado (ESBL)</i>	14
2.3.2.3 <i>Carbapenemases</i>	15
2.3.3. <i>Alteração da permeabilidade de membrana externa</i>	19
2.3.3.1 <i>Porina</i>	19
2.3.3.2. <i>Hiperexpressão de bomba de efluxo</i>	21
2.5. POLIMIXINAS	25
2.6. CONCENTRAÇÃO QUE PREVINE O APARECIMENTO DE MUTANTES RESISTENTES - MPC.	26
2.7. JANELA PARA SELEÇÃO DE MUTANTES	29
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. AMOSTRA BACTERIANA	34
3.2. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	34
3.2.1 <i>Disco-difusão</i>	35
3.2.2 <i>Ágar Diluição</i>	36
<i>Tabela 3. Variação das concentrações de antimicrobianos testadas para os isolados clínicos de Acinetobacter spp.</i>	37

3.2.3. Concentração que previne o aparecimento de mutantes (MPC).....	38
3.2.3.1. Contagem de colônias	40
3.2.3.2. Armazenamento das amostras mutantes.....	40
3.2.3.4. Correlação entre MIC e MPC.....	41
3.3 DETECÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	41
3.3.1. Taxa de hidrólise.....	41
3.3.2 Avaliação do perfil das proteínas de membrana externa (OMPs).....	43
3.3.3 Avaliação dos mecanismos cromossômicos de resistência às quinolonas...	45
3.3.3.1. PCR	45
3.3.3.1. Sequenciamento	46
3.3.4. Quantificação da transcrição gênica	47
3.3.5. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	47
3.3.6. Reação da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR).....	49
3.3.7. Análise da expressão gênica	51
4 RESULTADOS.....	53
4. 1. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS	53
4.2. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS AMOSTRAS CLÍNICAS DE <i>ACINETOBACTER</i> SPP.	53
4.2.3. Técnica de Disco difusão	53
4.2.3. Técnica de Ágar Diluição	54
4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO QUE PREVINE O APARECIMENTO DE MUTANTES RESISTENTES DOS DIVERSOS AGENTES ANTIMICROBIANOS ENTRE AS AMOSTRAS CLÍNICAS DE <i>ACINETOBACTER</i> SPP.	57
4.4. DETERMINAÇÃO DA JANELA PARA SELEÇÃO DE MUTANTES RESISTENTES DOS DIVERSOS AGENTES ANTIMICROBIANOS TESTADOS CONTRA AS AMOSTRAS DE <i>ACINETOBACTER</i> SPP. ..	60
4.5. DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE MIC E MPC	62

4.6. AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DAS AMOSTRAS MUTANTES	63
4.6.1. Avaliação da Produção de β -lactamases do Tipo AmpC	65
4.6.2. Avaliação do Perfil das Proteínas de Membrana Externa	65
4.7. PCR EM TEMPO REAL	74
5. DISCUSSÃO	97
6. CONCLUSÕES	112
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXOS	149

1. INTRODUÇÃO

Acinetobacter causa uma ampla variedade de doenças em pacientes debilitados e hospitalizados, especialmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (Bergogne-Berezin & Towner, 1996). Esse microrganismo sobrevive por um longo período de tempo no ambiente hospitalar (Munoz-Price & Weinstein, 2008), e constitui um importante patógeno oportunista em hospitais brasileiros (Sader *et al.*, 1998a; Sader *et al.*, 1999). Uma característica comum desta bactéria é a resistência intrínseca a múltiplos antimicrobianos (Jones, 2001; Forster, 1998).

Considerando-se que as bactérias tornam-se eventualmente resistentes a maioria dos antimicrobianos, é apropriado a análise cuidadosa das condições hospitalares que favorecem a seleção de bactérias resistentes e auxiliam a sua multiplicação e disseminação. Vários fatores que influenciam a seleção de mutantes resistentes têm sido descritos, como, o estado imunológico do hospedeiro; o número de bactérias no sítio infeccioso; o mecanismo de ação e a concentração alcançada pelo antimicrobiano no sítio infeccioso. Além destes, o uso de dispositivos invasivos em pacientes criticamente enfermos constituem outro fator, pois estes funcionam como porta de entrada e fonte rica de nutrientes para a multiplicação bacteriana. A infecção relacionada ao uso destes dispositivos freqüentemente resulta em infecções de alto inóculo permitindo a sobrevivência e multiplicação de mutantes naturalmente resistentes até mesmo quando o antimicrobiano tenha sido utilizado com sucesso na erradicação da maioria da população bacteriana (Baquero *et al.*, 1997; Urban *et al.*, 2003)

Estratégias como a racionalização do uso e o rodízio de antimicrobianos têm sido aplicadas com o objetivo de minimizar o desenvolvimento da resistência

bacteriana. Porém, apesar da utilização destas medidas, o número de relatos de amostras de *A. baumannii* multirresistentes tem aumentado consideravelmente (Bonten 2002). Entretanto, ausência de novas classes de antimicrobianos ativas contra estes patógenos e o aumento da morbi-mortalidade das infecções causadas por este microrganismo acarreta em sérios problemas terapêuticos (Moran & Mount, 2003).

Uma nova estratégia para evitar o surgimento de bactérias resistentes tem sido proposta. Trata-se da utilização clínica de antimicrobianos que selecionem o menor número de bactérias mutantes resistentes. Este conceito baseia-se na determinação da menor concentração de antimicrobiano que previne o surgimento de bactérias mutantes resistentes, a MPC.

O principal objetivo deste estudo foi determinar os antimicrobianos que possuem a menor relação MPC:MIC, entre as amostras de *Acinetobacter* spp. e, dessa maneira, distinguir os antimicrobianos capazes de menos selecionar e favorecer o crescimento de bactérias resistentes. Além da determinação da MPC para diversos agentes antimicrobianos, os principais mecanismos de resistência conhecidos às quinolonas, às polimixinas e às cefalosporinas de amplo espectro das amostras bacterianas mutantes também foram avaliados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Agente etiológico

Acinetobacter spp. são cocobacilos Gram negativos, não esporulados que apresentam movimento por contração devido à presença de fímbrias polares. Esses microrganismos apresentam metabolismo oxidativo, não fermentativo e crescem bem entre 33 e 35°C em meios de cultura comumente utilizados na rotina laboratorial. Alguns podem crescer em temperaturas acima de 40°C, característica esta, que pode ser utilizada na diferenciação das principais espécies. Apresentam as reações de oxidase negativa e catalase positiva. Em meios de cultura sólidos, as colônias possuem aspecto liso, de cor amarelo-pálido ou branco-acinzentado. A produção de pigmento marrom pode ser observada em algumas amostras ambientais (Pagel & Seyfried, 1976). No meio de cultura MacConkey, por exemplo, as colônias podem apresentar-se transparentes ou róseas, pois não utilizam a lactose como fonte de carbono (Von Graevenitz, 1995). São microrganismos estritamente aeróbios (Juni, 1972).

A situação taxonômica do gênero *Acinetobacter* tem passado por uma série de modificações, desde o seu primeiro relato de isolamento em 1909, a partir do solo, com a denominação de *Micrococcus calco-aceticus* (Baumann, 1968a; Baumann, 1968b; Baumann, 1968c). De acordo com o Manual Bergey de Bacteriologia e Sistemática de 1984 e o seu resumo publicado em 1994, os gêneros *Acinetobacter*, *Neisseria*, *Kingella* e *Moraxella* pertencem à família *Neisseriaceae*, porém, com base na hibridização DNA-DNA e na análise filogenética da seqüência do rDNA foi sugerido que os gêneros *Acinetobacter* e *Moraxella* fossem removidos da família *Neisseriaceae*

para a família *Moraxellaceae*. Contudo, em função da heterogeneidade bioquímica e genética entre os membros do grupo, estudos adicionais foram recomendados para que taxonomia deste gênero fosse definida (Bovre, 1984, Bouvet et. al., 1987; Tjernberg & Ursing 1989; Dijkshoorn, 1998).

Além do problema taxonômico relativo à denominação do gênero *Acinetobacter*, uma discussão ainda maior existe na literatura para que as espécies sejam claramente classificadas. Atualmente, o gênero *Acinetobacter* pode ser dividido por meio da hibridização DNA-DNA em pelo menos 21 genoespécies diferentes (Ehrenstein et al., 1996). Testes fenotípicos permitem uma identificação presuntiva da maioria das espécies, mas mesmo as principais galerias de testes bioquímicos são insuficientes para a identificação correta de todas as espécies genômicas de *Acinetobacter* (Bernards et al., 1996).

Para identificação do gênero *Acinetobacter*, estudos taxonômicos mais recentes, em sua maioria, utilizam-se de uma associação de métodos fenotípicos (utilização de 22 fontes de carbono) e métodos genotípicos de hibridização DNA-DNA, amplificação e clivagem do rDNA e, principalmente, o seqüenciamento das regiões 16S e 23S do rRNA, sendo o seqüenciamento da região 16S o mais utilizado (Carr et al., 2002; Harmsen et al., 2001; Nemeč et al., 2003). Estes estudos sugerem que novas espécies sejam incorporadas ao gênero *Acinetobacter* o que deu origem a uma lista de espécies já nomeadas e outras ainda consideradas numericamente como genoespécies. Esta lista pode ser encontrada com atualização no site www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy, ou como mostra o anexo 1 (data do último acesso 12/03/09).

2.2. Infecções causadas por *Acinetobacter* spp.

O gênero *Acinetobacter* tem se destacado, desde o início dos anos setenta, como um patógeno oportunista emergente, causando freqüentemente graves infecções nosocomiais, principalmente na forma de surtos e, esporadicamente, casos de infecções na comunidade (Villegas & Hartstein, 2003; Kanemoto, 2003). Apesar da sua baixa virulência, este patógeno constitui um sério problema terapêutico devido ao aumento e disseminação de amostras multirresistentes no Brasil e no mundo (Karlowsky *et al.*, 2003; Sader *et al.*, 1999; Gales, *et al.*, 2001, Montefour, 2008).

A versatilidade nutricional dos microrganismos pertencentes a este gênero facilita a sua adaptação ao meio ambiente, podendo ser isolado até mesmo em geleiras (Christner, *et al.*, 2003; Zeana *et al.*, 2003). Seu caráter ubiqüitário pode ser facilmente demonstrado, pois esse gênero é freqüentemente isolado em água doce ou salina (Bifulco *et al.*, 1989), no solo (Baumann, 1968a) e em esgotos (Warskow & Juni 1972), onde representam cerca de 50% dos microrganismos isolados. Até mesmo em solventes orgânicos aromáticos, como o petróleo, foram identificadas bactérias do gênero *Acinetobacter* (Petukhov *et al.*, 2000).

A presença de *Acinetobacter* spp. em vegetais foi verificada por Berlau *et al.* em 1999 e permitiu a sugestão de que esta seria uma possível via de entrada destes microrganismos nos hospitais (Zeana *et al.*, 2003). Entretanto, Zeana *et al.*, demonstraram, que a fonte de contaminação humana com cepas multirresistentes parece não ser a partir de reservatórios comunitários e, sim, de reservatórios existentes no próprio ambiente hospitalar (Zeana *et al.*, 2003).

Apesar do seu caráter oportunista, as espécies de *Acinetobacter* possuem características reconhecidas como fatores de virulência, principalmente, entre amostras

envolvidas em quadros infecciosos. O gênero *Acinetobacter* raramente tem sido envolvido em infecções na comunidade (Wang *et al.*, 2002; Anstey *et al.*, 1992), embora, nos últimos anos, novos casos têm sido destaque na literatura, até mesmo associado à colonização prévia sugerindo um aumento na característica patogênica deste microrganismo (Anstey *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002). Ao contrário, seu papel como patógeno hospitalar vem sendo demonstrado na literatura mundial desde os anos 70 e, tem aumentado a cada ano, sendo que, neste ambiente a espécie *A. baumannii* é a mais freqüentemente reportada (Bergogne-Berezin, 1994).

No ambiente hospitalar, *Acinetobacter* tem sido relatado como responsável por infecções graves como bacteremias e sepse (Seifert *et al.*, 1992; Smego, 1985; Westh *et al.*, 1991), infecções respiratórias (Anstey *et al.*, 1992; Buxton *et al.*, 1978; Hartstein *et al.*, 1988), infecções urinárias (Hoffmann *et al.*, 1982), endocardites (Gradon *et al.*, 1992), peritonites (Sureda *et al.*, 1988), meningites (Morgan & Hart 1982) e infecções em queimados (Sherertz & Sullivan, 1985). Esse microrganismo pode ser isolado em diversos sítios anatômicos, principalmente, no trato respiratório inferior e o no trato urinário (Joly-Guillou *et al.*, 1992). *Acinetobacter* spp. é o segundo bacilo Gram-negativo não fermentador mais comumente isolado em espécimes clínicos. Alguns fatores predisõem a ocorrência de infecções por *Acinetobacter* spp. como, antibioticoterapia prévia, procedimentos invasivos, doença crônica, imunossupressão e neoplasias (Villegas, 2003; Seifert *et al.*, 1995).

A respeito do modo de transmissão em ambiente hospitalar, o gênero *Acinetobacter* pode ser disseminado, principalmente, pelas mãos contaminadas (Musa *et al.*, 1995), água (Pina *et al.*, 1998), colchões (Sherertz & Sullivan, 1985), detergentes, telefones, pias, portas e canetas (Debast *et al.*, 1996). Este gênero é

freqüentemente encontrado em umidificadores (Gervich & Grout, 1985; Schloesser, 1990), cateteres (Pillay *et al.*, 1999) e tubos endotraqueais (Pawar *et al.*, 2003), favorecendo a ocorrência de surtos de infecções hospitalares, uma vez que *Acinetobacter* spp. podem sobreviver por 21 a 32 dias em objetos inanimados e em superfícies secas ou úmidas (Seifert, 1998).

As infecções hospitalares prolongam os dias de permanência dos pacientes nas unidades de terapia intensiva (UTI), elevando consumo de antibióticos e também o índice de mortalidade (Munoz-Price & Weinstein, 2008).

A incidência sazonal de infecção por *Acinetobacter* spp. foi reportada pela primeira vez, em 1979, por Retailiau e colaboradores que demonstraram o aumento da ocorrência de infecções no verão tardio e início do inverno e relacionaram este fato às mudanças na temperatura e na umidade (Retailiau *et al.* 1979). Fato semelhante foi observado vinte anos depois por McDonald e colaboradores que analisaram a porcentagem de infecções por *Acinetobacter* spp. reportadas pelo sistema *National Nosocomial Infection Surveillance* (NNIS), entre 1987 e 1996, e encontraram um aumento no número de infecção durante os meses de verão tardio (McDonald *et al.* 1999). As razões para a ocorrência deste fenômeno ainda não foram totalmente esclarecidas, mas acredita-se que exista uma relação entre o aumento da umidade e da temperatura ambiental ao crescimento desses microrganismos.

2.3. Resistência a antimicrobianos em amostras de *Acinetobacter* spp.

A resistência bacteriana a antimicrobianos tem se tornado um importante problema no Brasil e na maioria dos países do mundo (Jones & Pfaller, 1998; Guzman-

Blanco *et al.*,2000). Uma grande variedade de patógenos, que eram anteriormente sensíveis, tem adquirido resistência a um número cada vez maior de antibióticos. Além disso, microrganismos intrinsicamente mais resistentes, *Acinetobacter* spp., até pouco tempo extremamente raros no ambiente hospitalar, têm se tornado cada vez mais freqüentes (Jones, 2001; Forster & Daschner, 1998).

Para alguns agentes antimicrobianos, os mecanismos de resistência são conhecidos, enquanto que para outras classes há uma combinação de vários mecanismos, muitos deles ainda pouco compreendidos. Os mecanismos de resistência podem se dividir basicamente quanto a sua origem em dois grupos: aparecimento por meio de mutação celular ou pela aquisição de genes de resistência (Bergogne-Bérézín & Towner, 1996).

Os principais mecanismos de resistência encontrados em amostras de *Acinetobacter* spp. são: (i) alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs); (ii) perda ou diminuição na expressão de proteínas de membrana externa (porinas); (iii) hiperexpressão de bombas de efluxo; e, (iv) produção de β -lactamases. Recentemente sistemas de efluxo responsáveis por conferir resistência a antimicrobianos não relacionados tem sido descritos (Higgins *et al.*, 2004).

2.3.1. Alteração do sítio de ação dos antimicrobianos

A interação do antibiótico com o seu sítio de ação como por exemplo, a alteração nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) é geralmente específico, e uma variação mínima na molécula pode causar um importante efeito na ligação do antibiótico ao seu sítio.

As PBPs são os sítios de ação de uma das mais importantes classes de antimicrobianos: os β -lactâmicos. As (PBPs) são carboxipeptidases e transpeptidases localizadas na membrana citoplasmática que atuam na etapa final da síntese do peptideoglicano bacteriano, catalisando a transpeptidação entre as duas subunidades de mureína (Spratt & Cromei, 1998). Algumas delas atuam como enzimas líticas favorecendo a formação do septo para a divisão celular, e outras nas etapas finais de estrutura e formação da parede bacteriana (Spratt & Cromei, 1998). A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos devido a alterações nas PBPs é mais comum em microrganismos Gram-positivos. A inibição destas enzimas (PBP) por parte dos antimicrobianos β -lactâmicos produz a morte bacteriana pela lise celular.

Em *Acinetobacter* spp. já foram relatadas alterações na expressão e na afinidade das distintas PBPs aos diferentes β -lactâmicos, mais recentemente, em 2003, Fernandez-Cuenca e colaboradores indicam que a redução na expressão de PBP₂, associada à produção de β -lactamase, foi o mecanismo mais freqüente de resistência aos carbapenems em amostras de *A. baumannii* na Espanha (Fernandez-Cuenca, 2003; Buijs *et al.*, 2008; Russo *et al.*, 2009).

Outra classe de agentes antimicrobianos, cuja resistência em *Acinetobacter* spp. tem sido associada à alteração no sítio de ação é a classe das quinolonas. Os principais alvos de ação desses antimicrobianos são as topoisomerasas II (DNA girase) e topoisomerasas IV, enzimas necessárias à duplicação do DNA bacteriano e, conseqüentemente, à proliferação de novas células. A topoisomerase II e a topoisomerase IV são constituídas de duas subunidades GyrA e GyrB e ParC e ParE respectivamente.

A resistência às quinolonas ocorre de maneira gradual e cumulativa e está relacionada às mutações seqüenciais ocorridas nos genes *gyrA* e *gyrB*, *parC* e *parE* que codificam as subunidades GyrA e GyrB, ParC e ParE das topoisomerasas (Hooper, 2000). Embora as bases moleculares da resistência às quinolonas em *Acinetobacter* spp. ainda não estejam totalmente elucidadas, estudos demonstram que a resistência à ciprofloxacina está associada a uma única mutação no gene *gyrA* enquanto que para as novas quinolonas, como moxifloxacina, são necessárias duas mutações, uma no gene *gyrA* e outra adicional no gene *parC* (Spence & Towner, 2003; Vila *et al.*, 2002; Higgins, 2004).

2.3.2. Produção de β -lactamases

O principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos β -lactâmicos é decorrente da produção de enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico conhecidas como β -lactamases (Livermore, 1995). Isto se dá pelo fato de que, nas bactérias Gram negativas, estas enzimas ficam estrategicamente localizadas no espaço periplasmático, podendo alcançar maiores concentrações e agir de modo mais eficaz sobre os β -lactâmicos antes destes atingirem o seu alvo de ação, as PBPs (Bush *et al.*, 1995). Algumas β -lactamases utilizam íons zinco como cofatores enzimáticos, enquanto a grande maioria opera via produção de ésteres de serina (Livermore, 1995).

A resistência aos β -lactâmicos decorrente a produção de β -lactamase irá depender da quantidade de enzima produzida, da sua habilidade em hidrolisar o antimicrobiano em questão e da velocidade com que o β -lactâmico penetra pela

membrana externa bacteriana (Livermore, 1991). As β -lactamases são produzidas por inúmeras espécies bacterianas, apresentando grande diversidade. Além disso, o gene que codifica a sua produção pode estar localizado no DNA cromossômico ou no DNA extracromossômico (Medeiros, 1984).

Uma série de novas β -lactamases tem sido descobertas, mas ainda a classificação mais utilizada é aquela proposta por Bush, Jacoby e Medeiros em 1995 que é uma versão mais atualizada da classificação anterior proposta por Bush e colaboradores em 1989 (Bush *et al.* 1995). Essa classificação combina as características estruturais e funcionais das β -lactamases e esta dividida em quatro grupos. Com o advento de novas e importantes enzimas Bush, em 2001, adaptou sua classificação anterior adicionando à mesma a principal forma de aquisição dos genes codificadores das β -lactamases (Bush, 2001). A nova versão desta classificação é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação funcional e molecular das β -lactamases bacterianas

Classificação de BUSH-JACOBY-MEDEIROS, 1995		Classificação de AMBLER, 1989	Características funcionais	Nº estimado de enzimas	
Grupo Funcional	Subgrupos	Classe Molecular		1995	2000
1		C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais dos Gram-negativos. Isoladamente conferem resistência a todos os β -lactâmicos, exceto carbapenens. Não são inibidas pelo ácido clavulânico.	32	51
2		A, D	Grande maioria das enzimas é inibida por ácido clavulânico	136	256
	2 ^a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência às penicilinas	20	23
	2b	A	β -lactamases de espectro reduzido de bactérias Gram-negativas. Inclui TEM-1 e SHV-1.	16	16
	2be	A	β -lactamases de espectro ampliado conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos (ESBLs)	36	119
	2br	A	β -lactamases derivadas da TEM resistentes aos inibidores de β -lactamases (IRT)	9	24
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina	15	19
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina); pouco inibidas pelo ácido clavulânico	18	31
	2e	A	Cefalosporinas inibidas pelo ácido clavulânico	19	20
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenens com sítio ativo serina, inibidas pelo ácido clavulânico	3	4
3	3 ^a , 3b, 3c	B	Metallo- β -lactamases que conferem resistência aos carbapenens e todos os outros β -lactâmicos com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas por ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam	13	24
4		ND	Enzimas não seqüenciadas que não se encaixam em outros grupos	4	9

Abreviatura: N.D., não determinada (Adaptado do artigo de Bush, 2001).

No gênero *Acinetobacter*, já foram identificadas β -lactamases de todos os grupos definidos por de Bush, Jacoby e Medeiros, e de todas as classes moleculares definidas por de Ambler (Poirel & Nordmann, 2006a).

2.3.2.1. β -lactamase do tipo AmpC

As β -lactamases do grupo 1 de Bush, Jacoby e Medeiros (Bush *et al.* 1995) classe molecular C de Ambler (Ambler, 1980), conhecida como β -lactamases do tipo AmpC, são enzimas cromossômicas ou plasmidiais podendo ser induzíveis ou não. Na ausência de β -lactâmicos, é normalmente produzida em baixos níveis, mas na presença de β -lactâmicos indutores como, por exemplo, cefoxitina e imipenem, a produção pode aumentar de 100 a 1000 vezes (Jones, 1998; Philippon, 2002).

As β -lactamases do tipo AmpC conferem resistência às penicilinas, inclusive as associações com inibidores de β -lactamases (sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico), cefalosporinas de 1^o, 2^o e 3^o gerações, e aos monobactâmicos (aztreonam).

O aumento da expressão de AmpC pode ocorrer em função do antimicrobiano agir como indutor da produção dessa enzima. Alguns β -lactâmicos como a cefoxitina e o imipenem são potentes agentes indutores, podendo aumentar de 100 a 600 vezes a expressão dessas β -lactamases (Jones, 1998). Quando os antimicrobianos indutores são retirados, a produção pode voltar a níveis basais (Sanders *et al.*, 1997).

Embora essas β -lactamases sejam reportadas com maior frequência entre as amostras pertencentes ao grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp.,

Serratia marcescens, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* e *Morganella morganii*), também já foram detectadas no gênero *Acinetobacter* (Dane, *et al.*, 2002; Bou, 2000a). Estudos apontam para o fato de que a presença deste grupo de enzimas em amostras de *Acinetobacter* spp. é alta podendo alcançar até 82% (Danes, *et al.*, 2002). Um fato mais preocupante é a possibilidade destes genes responsáveis pela hiperprodução de AmpC em *Acinetobacter* spp. se encontrarem em seqüências de inserção que facilmente poderão ser associadas a um forte promotor resultando em altos níveis de resistência às cefalosporinas (Corvec, *et al.*, 2003).

2.3.2.2 β -lactamase de Espectro Ampliado (ESBL)

No grupo 2 da classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (Bush *et al.* 1995) estão as β -lactamases mediadas por plasmídios e que, geralmente, são inibidas pelos inibidores de β -lactamase como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Elas estão divididas segundo a classificação molecular de Ambler em duas classes A e D (Ambler, 1980).

As β -lactamases pertencentes ao grupo 2 da classificação de Bush, Jacoby e Medeiros e a classe molecular A de Ambler, conhecidas como β -lactamases de espectro ampliado (extended spectrum β -lactamases - ESBL), são geralmente encontradas em membros da família *Enterobacteriaceae*. Elas conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos monobactâmicos, mas não aos carbapenens (Bush *et al.* 1995).

Até 2003, PER-1 foi a única ESBL descrita em *Acinetobacter* spp., na Europa e na Ásia (Yong *et al.* 2003; Vahaboglu *et al.* 1997). Em agosto de 2003, uma outra ESBL, VEB-1, foi detectada em *A. baumannii* pela primeira vez. As amostras

produtoras de VEB-1 pertenciam a um mesmo clone e foram responsáveis por um surto de infecção em um hospital em Valência na França (Poirel *et al.*, 2003).

Mais recentemente uma nova ESBL foi descrita em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. denominada SCO-1 que hidrolisa penicilina em altos graus e cefalosporinas, mas carbapenens em baixos níveis (Poirel *et al.*, 2007).

Entre os antimicrobianos β -lactâmicos, os carbapenens são os agentes mais potentes e possuem grande estabilidade frente à hidrólise por grande parte das β -lactamases (Senda *et al.* 1996). Entretanto, recentemente, têm sido relatados isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* e alguns gêneros da família das Enterobactérias exibindo resistência a esses agentes (Chu *et al.*, 2001; Poirel & Nordmann, 2002).

2.3.2.3 Carbapenemases

A resistência aos carbapenens em *Acinetobacter* spp. é atribuída a varias causas, tal como a redução da expressão de proteínas de membrana externa (29kDa, 33-36kDa) e produção de carbapenemases (Quale, 2003). Alguns isolados de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenens podem produzir metalo- β -lactamase-M β L (Ambler classe B) ou mais comumente, enzimas do tipo OXA (Ambler classe D ou oxacilinases) (Urban, 2003).

As M β Ls possuem quatro características principais: (i) atividade contra os carbapenens; (ii) não hidrolisam os monobactâmicos, como aztreonam; (iii) são inibidas por agentes quelantes, como, EDTA, e derivados de thiol e, (iv) geralmente, requerem íons Zn^{+2} ou outros cátions divalentes como co-fator (Laraki *et al.*, 1999). Essas enzimas são produzidas constitutivamente por algumas espécies bacterianas,

como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp. e *Chryseobacterium meningosepticum* (Nordmann & Poirel, 2002).

O primeiro relato de uma MβL, IMP-1; transferível ocorreu em 1991, em um isolado clínico de *Serratia marcescens* no Japão, onde os carbapenems têm sido utilizado amplamente (Watanabe *et al.*, 1991). Após oito anos, em 1999, a segunda MβL, denominada VIM-1 foi caracterizada em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada em Verona, Itália (Lauretti *et al.*, 1999)

O gene *bla*_{IMP-1} freqüentemente é encontrado em genes cassetes, inseridos em integrons da classe 1 (Laraki *et al.*, 1999b), que além de carregarem o gene *bla*_{IMP-1} também carregam outros genes de resistência (Arakawa *et al.*, 1995).

Somente em 2003, pela primeira vez, uma amostra de *A. baumannii* produtora de MβL, IMP-1, foi descrita no Brasil. O isolado foi proveniente de uma cultura quantitativa de secreção traqueal de um paciente internado na UTI geral do Hospital São Paulo no ano de 2000 (Gales, 2003).

Atualmente, existem oito diferentes tipos de MβL descritas mundialmente, IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KLM e, mais recentemente NDM.

As MβL do tipo SPM, GIM e SIM não tem sido isoladas fora do país de origem. Entretanto, isolados portadores de VIM e IMP se disseminaram mundialmente (Queenan & Bush, 2007). Desde então, já foram descritas 22 variantes de IMP, em diferentes regiões geográficas e 18 diferentes tipos de VIM, a maior parte na Europa, mas variantes também foram encontradas na América do Norte, na América Latina e na Ásia (Galani *et al.*, 2004; Libisch *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2004b; Patzer *et al.*, 2004; Toleman *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2003).

As oxacilinas são um importante grupo de β -lactamase descritas em *Acinetobacter* spp. Essas enzimas são pertencentes ao grupo 2 da classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (Bush, 1995), porém agrupadas na classe molecular D de Ambler (Ambler, 1980). Este grupo de β -lactamases possui como substrato preferencial a oxacilina, e são inibidas fracamente pelo ácido clavulânico. Estas enzimas não dependem do zinco como co-fator de atividade. *A. baumannii* produz intrinsecamente alguns tipos dessa β -lactamase, como por exemplo as variantes das oxacilinase tipo OXA 51 e 69.

Algumas enzimas da família das oxacilinas possuem atividade hidrolítica contra os carbapenens e são, geralmente, encontradas em *Acinetobacter* spp. (Walther-Rasmussen, 2006). Essas enzimas, em sua maioria, são codificadas por genes inseridos em cassetes de integron de classe 1 (Recchia & Hall, 1995). Porém, as carbapenemases de *Acinetobacter* spp. são codificadas por genes cromossomais (Afzal-Shah *et al.*, 2001), com exceção da oxacilinase OXA-23 (anteriormente designada como ARI-1), cuja produção é mediada por um gene plasmidial (Senda *et al.*, 1996).

Três principais tipos de β -lactamase da classe D que hidrolizam carbapenens em *A. baumannii* têm sido descritas, sendo as oxacilinas do tipo OXA-23, OXA-40 e OXA-58 (Poirel *et al.*, 2008). Essas enzimas conferem uma diminuição na sensibilidade ou resistência aos carbapenens em *A. baumannii* (Héritier *et al.*, 2005a).

O primeiro relato de OXA β -lactamase com atividade de hidrolisar carbapenens foi descrita por Paton em 1993. Essa enzima foi encontrada em uma amostra clínica de *A. baumannii* multirresistente que foi isolado de um paciente em Edinburgh na

Escócia (Paton *et al.*, 1993). Posteriormente, outras OXA β -lactamases foram descritas em amostras de *Acinetobacter* spp. em diferentes países e, em alguns casos causando surtos (Afzal-Shah *et al.*, 2001; Lopez-Otsoa *et al.*, 2002). Por exemplo, OXA-23 tem sido identificada em surtos de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenems no Brasil, Colômbia, Reino Unido, Coreia, Taiti, e China (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2006; Naas *et al.*, 2005; Villegas *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007). OXA-24 e OXA-40 foram encontradas em clones de *Acinetobacter* spp. causando surtos hospitalares na Espanha e Portugal (Bou *et al.*, 2000b; Lopez-Otsoa *et al.*, 2002; Da Silva, *et al.*, 2004). OXA-40 foi também a primeira OXA carbapenemase reportada nos Estados Unidos (Lolans *et al.*, 2006). *Acinetobacter* spp. produtores de OXA-23 e OXA-58 carbapenemases causaram múltiplas infecções em soldados americanos que serviram o Iraque e o Afeganistão entre 2003 e 2005 (Hujer *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2006).

Embora a produção de oxacilinas conferia redução da sensibilidade aos carbapenems, o alto nível de resistência aos carbapenems é observado apenas quando a produção desta enzima é associada a hiperexpressão de mecanismos adicionais de resistência como sistema de efluxo (Marques *et al.*, 2005; Poirel *et al.*, 2006a). Esse fato foi identificado primeiramente, na França, em 2003, e, atualmente é reportado mundialmente em isolados clínicos de *A. baumannii* (Peleg *et al.*, 2006., Poirel *et al.*, 2006b, Ruiz, *et al.*, 2007; Salazar *et al.*, 2007)

Recentemente, o número de OXA-carbapenemases tem aumentado gradativamente, e elas estão divididas em oito grupos (Walther-Rasmussen, 2006). Além disso, há evidência crescente que o *A. baumannii* codifica naturalmente o gene carbapenemase *bla*_{oxa-51-like} (Héritier, 2005b; Merkier, 2006; Turton, 2006a;

Woodford, 2006) Semelhante a maioria das outras OXA-carbapenemases, a enzima OXA-51-like mostra fraca atividade contra os carbapenens, entretanto, a inserção de da seqüência *ISAbal upstream* do gene *bla_{oxa-51-like}* pode ativar um gene promotor que permite a hiperexpressão de carbapenemase, e isso resulta na resistência aos carbapenens (Turton, 2006b).

Até o momento, foram identificados 147 tipos de OXA β -lactamases, dos quais 9 são β -lactamase de espectro ampliado e pelo menos 37 são consideradas carbapenemases (Walther-Rasmussen & Hoib, 2006).

2.3.3. Alteração da permeabilidade de membrana externa

2.3.3.1 Porina

Porinas são proteínas presentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas, essas proteínas são capazes de formar canais constituídos de água no seu interior. Estes canais são responsáveis pelo transporte de solutos hidrofílicos e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana (Nikaido, 1994; Vila *et al.*, 2007).

Na nomenclatura das porinas, utiliza-se o termo Omp do inglês “*outer membrane protein*” de *E. coli*, microrganismo no qual elas foram sistematicamente estudadas.

A variação na estrutura dessas OMPs contituem uma estratégias para sobrevivência que tem sido desenvolvida por algumas bactérias. Essas porinas podem apresentar um significativo papel nos mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Vila *et al.*, 2007).

As porinas podem aumentar ou diminuir as taxas de penetração dos antibióticos β -lactâmicos na célula bacteriana (Nitzan, 20029). Cada microrganismo possui características próprias e, quanto à permeabilidade da membrana externa, sabe-se que a membrana de *P.aeruginosa* é 100 vezes menos permeável do que a membrana externa de *E. coli* (Parr, 1987; Yamazaki 1989). Sato & Nakae em 1991, sugeriram, através de experimentos, que a permeabilidade da membrana externa de *A. baumannii* é ainda menor que aquela encontrada em *P.aeruginosa* (Sato, 1991), fato que influencia na entrada de antimicrobianos no interior da bactéria. Vila e colaboradores também confirmaram a redução da permeabilidade da membrana de *Acinetobacter* spp. em relação àquela apresentada por *E. coli* (Vila *et al.*, 2007).

Uma propriedade ainda não muito bem esclarecida em isolados de *A. baumannii* é a respeito da permeabilidade da membrana externa. Entretanto, um pequeno número de porinas pode explicar um decréscimo na permeabilidade de membrana externa de *A. baumannii* (menor que 5%) (Obara, 1991).

Em algumas espécies, é claramente reconhecida a importância da perda, hiper ou diminuição da expressão de uma ou mais OMPs na resistência aos antimicrobianos (Livermore, 2001). Porém em *Acinetobacter* spp. ainda não é bem definido quais são as OMPs associadas à resistência aos diversos antimicrobianos. Vários estudos têm observado que a diminuição da expressão de algumas OMPs tem sido associada a resistência antimicrobiana em *A. baumannii* (Sato, 1991; Bou, 2000b; Mussi, 2005). Recentemente, tem sido descrita e caracterizada em diferentes espécies de *Acinetobacter* porinas da família OmpA (Nikaido, 2003). Essas porinas estão relacionadas ao transporte de β -lactâmicos e sacarídeos de aproximadamente 800 Da (Nitzan, 1999; Gribun, 2003).

Mais recentemente, Sirot e colaboradores indicaram que a perda de uma OMP de 29 KDa foi responsável pela resistência a imipenem em *A. baumannii* (Siroy *et al.*, 2005, Mussi, 2005). Essa porina é denominada CarO e pertence à nova família β -Barrel aparentemente restrita apenas em microrganismos da família *Moraxellaceae*. Ainda em 2005, Tomás verificou que a perda ou diminuição de uma porina de 33-36KDa também estaria relacionada com a resistência aos carbapenems (Tomás, 2005).

Finalmente, uma outra Omp descrita em *Acinetobacter* é a OmpW, que apresenta alta homologia com as OmpW encontradas em *E. coli* e *P. aeruginosa*. A função desta porina em *A. baumannii* ainda não é bem esclarecida, entretanto, a diminuição da expressão desta porina parece estar relacionada com a resistência *in vitro* à colistina (Vila *et al.*, 2007; Hong, 2006).

2.3.3.2. Hiperexpressão de bomba de efluxo

O sistema de efluxo funciona devido à atuação de proteínas de membrana especializadas envolvidas na extrusão de substratos tóxicos de dentro da célula para o ambiente externo (Weebber, 2003).

O sistema de efluxo é expresso em todas as células vivas, esse sistema atua principalmente na proteção celular contra efeitos tóxicos. Entretanto, em bactérias multirresistentes estes sistemas de transporte podem estar hiperexpressos (Nikaido, 2001).

O sistema de bombas de efluxo pode transportar substratos específicos ou compostos com estruturas bem variadas (Weebber, 2003). Atualmente, seis famílias de bombas de efluxo são descritas (Figura 1): i) *major facilitator family*, ii) *resistance-*

nodulation-division family ou RND, iii) SMR - *staphylococcal multidrug resistance family*, iv) *ATP-cassete transporters*, v) MATE – *multidrug and toxic compound extrusion* e vi) ATP dependente (Nikaido, 2001; Vila 2007, Poole, 2002).

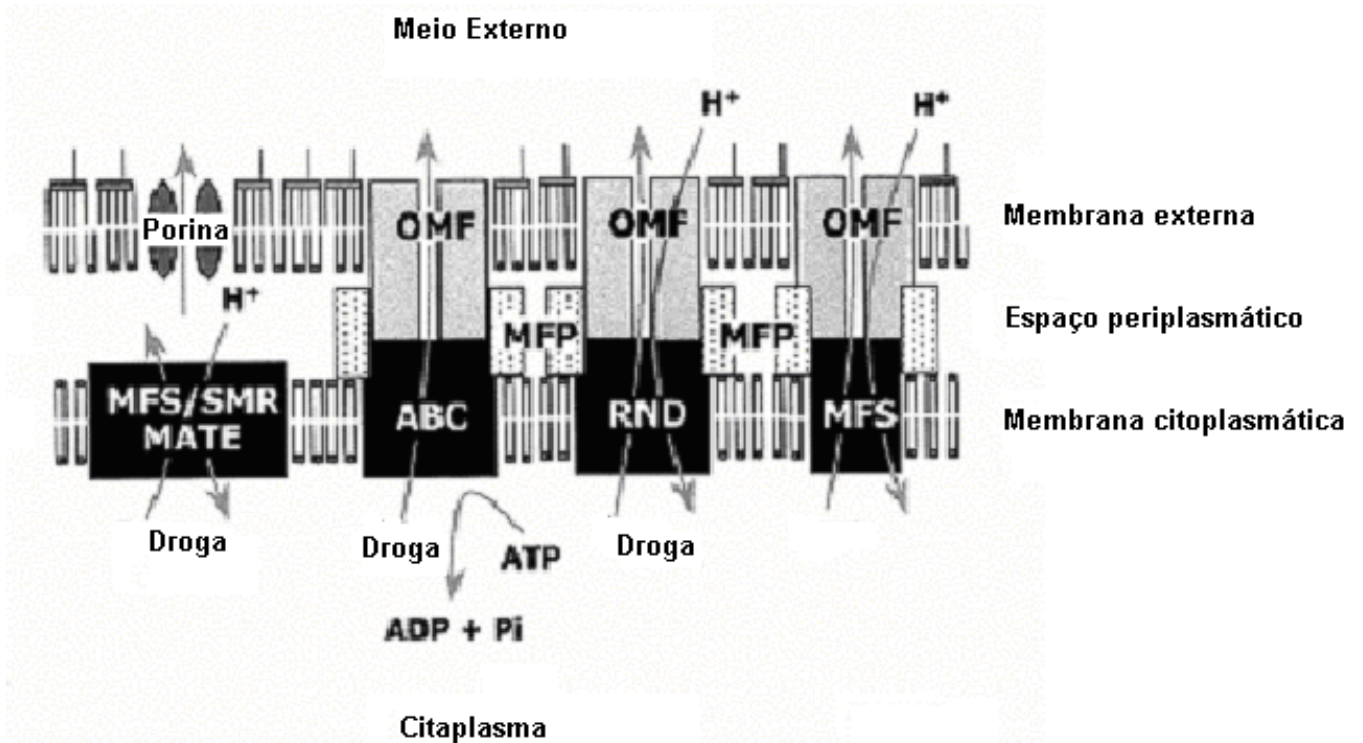


Figura 1. Esquema representativo da principais famílias de sistema de efluxo localizado na membrana de bactérias Gram-negativas.

Em *A. baumannii* a resistência antimicrobiana mediada pela expressão de sistemas de efluxo está geralmente associada aos sistemas das famílias MFS e RND. Alguns sistemas de bombas de efluxo já descritos em *Acinetobacter* spp. e a sua atividade aos diversos agentes antimicrobianos podem ser visualizados em resumo na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade dos sistemas de bomba de efluxo descritos em *A. baumannii*.

Bomba de efluxo	Família	Antimicrobianos
Tet (A)	MFS	Tetraciclina
TET (B)	MFS	Tetraciclina, minociclina
CmlA	MFS	Cloranfenicol
AdeABC	RND	Aminoglicosídeo, β -lactâmico, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, brometo de etidio e diminuição da sensibilidade às fluoroquinolonas
AbeM	MATE	Norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacina, gentamicina, triclosan, acriflavina, daunorubicina, rodamina, brometo de etidio, etc.

(Adaptado do artigo de Vila *et al.*, 2007)

O sistema de efluxo Tet, pertencente à família MFS, é um dos mais importantes mecanismos de resistência à tetraciclina em bactérias Gram-negativas (Vila *et al.* 2007). Esse gene pode estar presente em transposons e inserido em plasmídeo, esse sistema é regulado pela presença da tetraciclina. A hiperexpressão desta bomba de efluxo não afeta as novas tetracilinas como as glicilciclinas (Vila *et al.* 2007).

Um outro de sistema de efluxo descrito em *Acinetobacter* spp. é o AbeM pertencente a família MATE. Esse sistema é responsável pela redução da MIC (maior que 4 vezes) para norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacina e gentamicina. Da mesma maneira, reduz a MIC em até 2 vezes para canamicina, eritromicina, cloranfenicol e trimetoprim (Sue *et al.*, 2005).

Estudos de resistência antimicrobiana mediada por sistemas de efluxo ativo ainda são poucos, apenas o sistema, AdeABC, que confere resistência a múltiplos

antimicrobianos tem sido identificado e estudado mais detalhadamente em amostras de *Acinetobacter* spp. (Higgins *et al*, 2004; Magnet *et al.*, 2001).

Atualmente, a hiperexpressão da bomba de efluxo AdeABC, pertencente a família RND, tem sido freqüentemente reportada em *Acinetobacter* spp. (Ruzin, 2007; Vila, 2007; Marchand 2004). Essa bomba de efluxo necessita de prótons para expelir a droga para o exterior da célula. A maioria desse transporte interage com uma proteína de fusão de membrana (MFP – membrane fusion protein) e uma Omp. Assim, o sistema de efluxo AdeABC é composta por três componentes:

- AdeA: é a MFP;
- AdeB: é o transportador (bomba);
- AdeC: proteína de membrana externa (porina).

A hiperexpressão da bomba AdeABC pode conferir resistência aos aminoglicosídeo, β -lactâmicos, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e brometo de etídio (Magnet, 2001; Marchand, 2004). Além disso, a bomba AdeB também tem sido associada com a redução da sensibilidade as fluoroquinolonas (Higgins, 2004).

A presença da Omp AdeC não é essencial para causar resistência porque esse sistema de efluxo pode ser associado a outras Omps como por exemplo AdeK (Marchand, 2004). Essa Omp parece estar ligada a um novo sistema de efluxo em *A. baumannii*, mas que ainda não foi caracterizado (Marchand *et al.*, 2004).

2.5. Polimixinas

Recentemente, o aparecimento de bactérias com resistência a todos antimicrobianos disponíveis é maior em bactérias Gram-negativas, principalmente entre os isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Zavascki, 2007; Rahal, 2006). A falta de opção para o tratamento de infecções graves, causadas por esses microrganismos multirresistentes, tem restaurado a utilização parenteral das polimixinas (Levin *et al.*, 1999).

As polimixinas, são antimicrobianos originários de um produto natural da fermentação do *Bacillus polymyxa* e pertencem à classe dos polipeptídeos. Das cinco polimixinas reconhecidas (A, B, C, D, E), somente as polimixinas B e E (colistina) são utilizadas clinicamente (Storm, 1977).

A ação detergente sobre as membranas, principalmente em bactérias Gram-negativas, leva a rápidas mudanças na permeabilidade da membrana citoplasmática e, conseqüentemente, à morte celular (Wiese *et al.*, 1998). Por este mecanismo de ação sobre as membranas, seus efeitos tóxicos são importantes (Koch-Weser *et al.*, 1970). Este fato fez com que esta classe de drogas passasse a ter uma utilização mais restrita, deixando até mesmo de existir um critério para interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade após 1976 (Gales *et al.*, 2001).

Estudos mais recentes têm demonstrado que a utilização de polimixina B, em casos graves de infecções, é efetiva e apresenta menor toxicidade que anteriormente relatada (Levin, 2003; Ouderkirk *et al.*, 2003; Zavascki, 2007).

No Brasil, particularmente no Hospital São Paulo /EPM/UNIFESP/São Paulo, já foram detectadas e descritas na literatura amostras de *Acinetobacter* spp.

resistentes à polimixina B. Considerando o fato de que esta classe de droga é utilizada em infecções causadas por amostras multirresistentes, o relato de amostras resistentes, causa uma grande preocupação pois haveria limitação nas opções terapêuticas disponíveis, restringindo-se basicamente às glicilciclinas para o tratamento destas infecções (Reis *et al.*, 2003).

Um passo inicial e crítico em ação das polimixinas em bactérias Gram-negativas é a interação eletrostática entre o peptídeo carregado positivamente e o LPS que é negativamente carregado (Clausell, 2007). Assim, a maioria dos mecanismos de resistência as polimixinas estão baseados na modificação do LPS o que para ou reduz o início dessa interação eletrostática.

A modificação da LPS não é o único mecanismo de resistência descrito em polimixina, a presença de cápsula e a alteração em algumas proteínas de membrana externa, como OmpH, OmpU, OmpW, também têm sido relatadas em amostras resistentes as polimixinas (Campos *et al.*, 2004; Mathur & Waldor, 2004; Hong, 2006).

2.6. Concentração que previne o aparecimento de mutantes resistentes - MPC

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas com o objetivo de reduzir o desenvolvimento da resistência bacteriana. As estratégias mais frequentemente aplicadas são a racionalização do uso e o rodízio de antimicrobianos. Apesar de evidências indicarem que estas estratégias quando utilizadas corretamente têm sido efetivas, o número de bactérias multirresistentes tem crescido a cada dia, sendo

necessário portanto novas estratégias que tentem evitar a aquisição da resistência (Bonten 2002; Zhao & Drlica, 2008).

Uma nova estratégia para evitar o surgimento de bactérias resistentes tem sido proposta. Este novo conceito proposto é baseado na concentração de antimicrobiano que previne o surgimento de bactérias mutantes resistentes, denominado MPC – “*Mutant Prevention Concentration*” (Blondeau *et al.*, 2001; Drlica, 2001; Zhao & Drlica, 2001).

Sabe-se que bactérias mutantes resistentes ocorrem naturalmente em uma população bacteriana mesmo antes de terem sido expostas a antimicrobianos. Infelizmente, não se conhece uma maneira de impedir que estes mutantes apareçam. Entretanto, estas mutações espontâneas ocorrem em uma frequência muito baixa (10^{-6} ou 10^{-8}) e o próprio sistema imune do paciente, na maioria das vezes, é capaz de eliminá-las. Porém, se há o surgimento de condições que favoreçam a seleção e a multiplicação destes mutantes, este equilíbrio é rompido e o número de mutantes aumentará gradualmente como ilustra a Figura 2 (Blondeau *et al.*, 2004; Drlica, 2001; Zhao & Drlica, 2001).

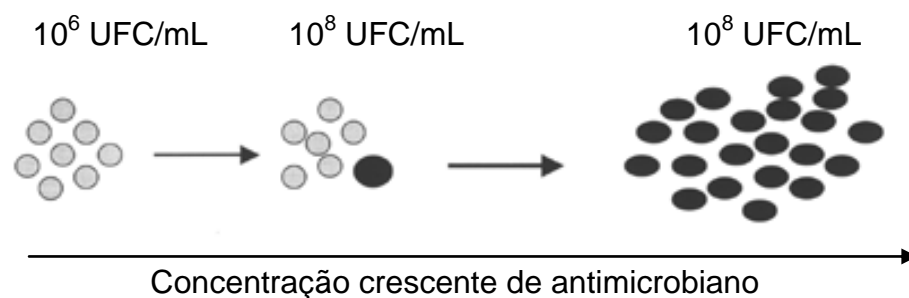


Figura 2. Ilustração esquemática da seleção de subpopulações mutantes resistentes.

Atualmente, os testes de sensibilidade utilizados para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) são baseados na aplicação de um inóculo que pode variar de 10^4 - 10^5 UFC/mL. Este valor encontra-se abaixo do valor no qual mutantes resistentes ocorreriam naturalmente. Entretanto, quando se avalia a concentração de antimicrobiano que previne o surgimento de bactérias mutantes resistentes (MPC), um inóculo significativamente maior ($\geq 10^{10}$ UFC/mL) tem sido utilizado (Drlica & Zhao, 2007).

A MPC é definida como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de bactérias mutantes resistentes quando uma concentração de bactérias $\geq 10^{10}$ UFC/mL é aplicada em placas de ágar contendo diferentes concentrações de antimicrobianos. A MPC também pode ser definida como a MIC das bactérias mais resistentes, ou seja, daquelas que sofreram algum tipo de mutação (Blondeau *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 1999; Drlica, 2001; Zhao & Drlica, 2001).

Algumas considerações podem ajudar a esclarecer a escolha de um inóculo contendo pelo menos 10^{10} UFC/mL (Blondeau *et al.*, 2004; Drlica, 2003; Li *et al.*, 2002; Zhao & Drlica, 2001):

- i) amplo número de subpopulações de mutantes resistentes presentes no teste;
 - ii) raramente infecções contêm mais do que 10^{10} organismos;
 - iii) é muito difícil reproduzir e testar *in vitro* um inóculo superior a este.
-

Os fatores que influenciam a MPC ainda não estão muito bem esclarecidos. Um recente estudo mostrou que a MPC não pode ser predita com a mesma precisão da MIC (Marcusson *et al.*, 2005).

2.7. Janela para seleção de mutantes

Na década de 90, Baquero sugeriu que existia um intervalo de concentração antimicrobiana, onde mutantes eram selecionados freqüentemente (Baquero, 1990; Baquero, 1997), após ensaios realizados com *E. coli* produtora de ESBL e *Enterobacter cloacae* produtora de AmpC. O favorecimento do crescimento de mutantes resistentes ocorre em uma área denominada de “janela para seleção de mutantes” (“Mutant Selection Window”- MSW). Os limites dessa região foram posteriormente definidos quando a MPC foi determinada para as fluoroquinolonas (Blondeau *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2003; Sindelar *et al.*, 2000; Zhao & Drlica, 2002).

Drlica e colaboradores observaram que a seleção de mutantes resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus* para as fluoroquinolonas acontecia exclusivamente entre um intervalo específico denominado janela para seleção de mutantes resistentes. O limite inferior dessa janela seria a MIC, enquanto a concentração que impede o crescimento de mutantes seria a MPC. Portanto, a janela para seleção de mutantes se situa acima da concentração inibitória mínima (MIC) e abaixo da MPC, como mostra a Figura 3.

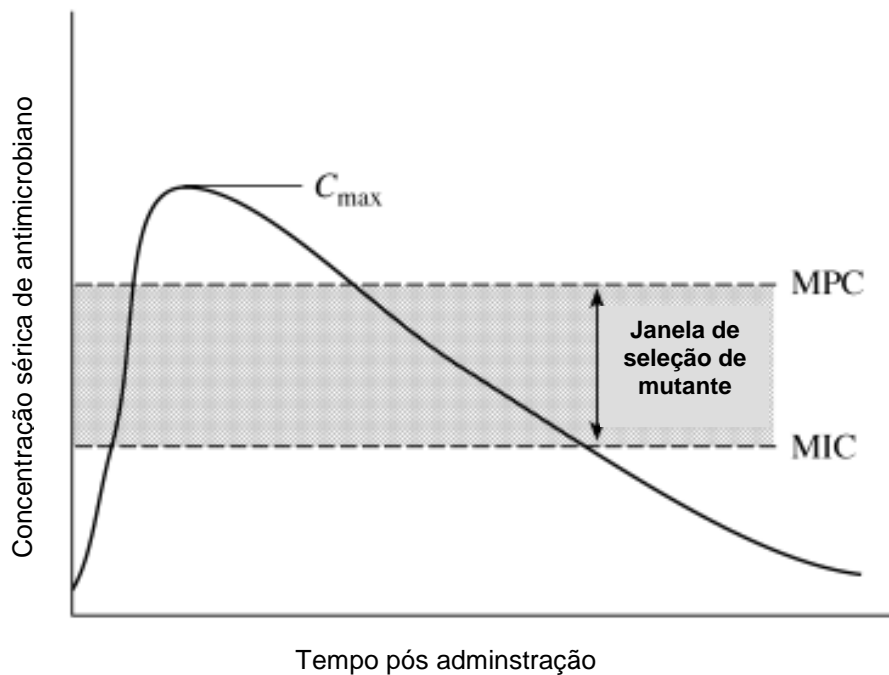


Figura 3. Perfil farmacocinético hipotético demonstrando que a janela para seleção de mutantes fica localizada entre a MIC e MPC. (Adaptado do artigo do Drlica, 2003)

Quando a concentração do antimicrobiano se situa na janela para seleção de mutantes resistentes, ou seja, entre os valores da MIC e da MPC, há um declínio no número de bactérias sensíveis, entretanto, são criadas condições para a seleção e o favorecimento do crescimento de bactérias mutantes resistentes (Blondeau *et al.*, 2004; Drlica, 2003). Assim, quando um amplo número de pacientes são tratados com concentrações dentro da MSW, a sensibilidade diminui gradualmente. Eventualmente a concentração antimicrobiana atinge um ponto, no qual o agente antimicrobiano torna-se ineficaz. Com intuito de restringir o desenvolvimento da resistência, a concentração antimicrobiana no local da infecção deve permanecer acima da MPC (Drlica, 2003). Quando isso não é possível, é recomendada a associação de agentes antimicrobianos para o tratamento da infecção afim de reduzir a possibilidade de falha terapêutica (Dong *et al.*, 1999; Sindelar *et al.*, 2000).

Como a distância entre a MIC e a MPC pode variar consideravelmente entre os diferentes antimicrobianos e de uma espécie bacteriana para outra, a extensão da janela para seleção de mutantes é específica para cada combinação bactéria *versus* antimicrobiano (Zhao & Drlica, 2002). Eliminar a janela para seleção de mutantes é o preceito básico para prevenir o favorecimento do crescimento de bactérias mutantes resistentes. Duas estratégias podem ser utilizadas para reduzir esta janela.

Primeira: minimizar o tempo na qual a droga permanece no intervalo entre a MIC e a MPC, isso pode ocorrer utilizando antibióticos que passam rapidamente através da janela, depois da administração da primeira dose até o final do tratamento, e que durante o período do tratamento permanecem acima da MPC (Zhao & Drlica, 2001).

Segunda: estreitar a janela para seleção de mutantes reduzindo a diferença entre a MIC e a MPC. Quanto menor a relação MPC:MIC, menor a chance dos antimicrobianos selecionarem mutantes resistentes. Então, a razão entre a MPC e a MIC, também pode ser utilizada para comparar os agentes antimicrobianos em relação à sua capacidade de selecionar mutantes resistentes (Zhao & Drlica, 2001; Drlica, 2003).

O conceito da MPC vem sendo amplamente difundido baseado nos resultados obtidos de estudos que avaliaram a MPC das fluoroquinolonas entre as diversas espécies bacterianas, incluindo-se Gram-positivos, Gram-negativos e micobactérias (Zhao & Drlica, 2001, Hovde *et al.*, 2003). O alto grau de resistência às fluoroquinolonas surge de maneira gradual e cumulativa através de mutações sucessivas, o que torna o conceito da MPC aplicável (Hooper, 2001). Ainda são

poucos os estudos publicados a respeito deste conceito para essas outras classes de antimicrobianos (Hovde *et al.*, 2003;Gugel, 2006).

Estudo realizado por Gugel e colaboradores demonstraram que a avaliação da MPC pode identificar o β -lactâmico que menos favorece o aparecimento de subpopulações mutantes resistentes. Esse estudo foi realizado com amostras de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Portanto, o uso da MPC pode também ser aplicada aos antimicrobianos β -lactâmicos para estes microrganismos. Esse estudo também enfatiza a importância da avaliação da MPC para selecionar a melhor dose de antimicrobiano para o tratamento de infecções, com intuito de minimizar o aparecimento de mutantes resistentes durante a terapia antimicrobiana (Gugel, 2006).

2. OBJETIVOS

1. Determinar os antimicrobianos que possuam a menor relação MPC:MIC entre as amostras de *Acinetobacter* spp.
 2. Avaliar as mutações nas regiões determinantes de resistência às quinolonas dos genes *gyrA* e *parC* em amostras mutantes selecionadas resistentes às quinolonas.
 3. Avaliar o perfil das proteínas da membrana externa em amostras mutantes selecionadas resistentes às polimixinas, às cefalosporinas de amplo espectro e carbapenens.
 4. Avaliar a hiperprodução de β -lactamases do tipo AmpC em amostras mutantes selecionadas resistentes às cefalosporinas de amplo espectro e carbapenens.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostra Bacteriana

A fim de se obter apenas isolados sensíveis às fluoroquinolonas, cefalosporinas de amplo espectro, aos carbapenens e às polimixinas B; 50 amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. foram subcultivadas do Banco de Microrganismo do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) da Universidade Federal de São Paulo/ EPM para confirmação da identificação e do perfil de sensibilidade, previamente realizados pelo Laboratório Central do Hospital São Paulo. As amostras foram provenientes de hemoculturas de pacientes hospitalizados no complexo do Hospital São Paulo entre o período de maio de 1993 a dezembro de 1999. Somente uma amostra por paciente foi incluída no estudo.

A confirmação da identificação bacteriana e do perfil de sensibilidade foram realizados no LEMC. Para identificação bacteriana, foi utilizado testes bioquímicos convencionais e o sistema BBL “Crystal Identification Systems Enteric/Nonfermenter ID” (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA).

3.2. Determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Os isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. foram inicialmente classificados como sensíveis às fluoroquinolonas, às cefalosporinas de amplo espectro, aos carbapenens e às polimixinas pela técnica de disco difusão e, posteriormente, tiveram o seu perfil de sensibilidade a antimicrobianos também

determinado pela técnica de ágar diluição de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2006a; 2006b).

Para o controle de qualidade dos testes de sensibilidade as amostras da *American Type Culture Collection* (ATCC) *E. coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas.

3.2.1 Disco-difusão

Colônias frescas de *Acinetobacter* spp. foram inoculadas em 5 mL de caldo Müeller-Hinton a fim de se obter um inóculo igual a 0,5 da escala de McFarland. Com o auxílio, de um swab o inóculo foi semeado na placa de ágar Müeller-Hinton. Antes da aplicação dos discos, as placas semeadas foram deixadas em temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos para permitir que o excesso de umidade na superfície do ágar fosse absorvido.

Os discos foram retirados do freezer uma hora antes de sua aplicação e deixados à temperatura ambiente. A aplicação foi realizada com auxílio de uma pinça estéril, pressionando-se os discos suavemente contra a superfície do ágar. Os discos de antimicrobianos (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra) utilizados foram: ceftazidima; cefepima; meropenem; imipenem; aztreonam; polimixina B; colistina; ampicilina/sulbactam, ciprofloxacina e ticarcilina/ácido clavulânico

As placas foram incubadas a 35°C por 18 a 24 horas em ar ambiente. Após este período, foi realizada a leitura dos halos de inibição com auxílio de

paquímetro digital, os quais foram interpretados de acordo com os critérios de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2006a).

3.2.2 Ágar Diluição

Para a confirmação do perfil de sensibilidade, as 20 amostras de *Acinetobacter* spp. selecionadas previamente pela técnica de disco-difusão foram testadas também pela técnica de ágar diluição para fluoroquinolonas, cefalosporinas de amplo espectro, carbapenens e polimixina B de acordo com os critérios preconizados pelo CLSI 2006b.

De acordo com as normas estabelecidas pelo CLSI, a seguinte fórmula foi utilizada para calcular a quantidade de sal de antimicrobiano necessária, a fim de obter a concentração desejada da solução estoque (CLSI, 2006b).

$$\text{Peso do sal (mg)} = \frac{\text{volume de solução estoque desejada (mL)} \times \text{concentração } (\mu\text{g/mL}) \text{ desejada}}{\text{atividade do antimicrobiano } (\mu\text{g/mg)}}$$

A partir da solução estoque, foram realizadas diluições seriadas em caldo Müller- Hinton (MHB, Oxoid, Inglaterra) em concentrações 10 vezes superiores às concentrações testadas (CLSI, 2006) (Tabela 3). Essas soluções foram distribuídas em alíquotas e conservadas à -70°C. Para os antibióticos, que já estavam na forma de solução, foi utilizada a seguinte fórmula para atingir a maior concentração desejada, e a posteriormente realizar as diluições seriadas.

$$C_{\text{inicial}} \cdot V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \cdot V_{\text{final}}$$

Tabela 3. Variação das concentrações de antimicrobianos testadas para os isolados clínicos de *Acinetobacter* spp.

Antimicrobiano (Fonte)	Concentração da Solução Estoque	Concentrações Testadas
Ceftazidima (Teuto, Anápolis, Brasil)	3.200 µg/mL	0,25-32 µg/mL
Cefepima (Bristol-Myers Squibb, Guayaquil, Equador)	3.200 µg/mL	0,25-32 µg/mL
Imipenem (Merck Sharp&Dohme, Elkton, EUA)	3.200 µg/mL	0,06-32 µg/mL
Meropenem (BioChimico, Rio de Janeiro, Brasil)	3.200 µg/mL	0,06-32 µg/mL
Ciprofloxacina (Fresenius Kabi, Tal Shirur, Índia)	3.200 µg/mL	0,03-32 µg/mL
Levofloxacina (Eurofarma, São Paulo, Brasil)	3.200 µg/mL	0,03-32 µg/mL
Gatifloxacina (Bristol-Myers Squibb, Illinois, EUA)	3.200 µg/mL	0,03-32 µg/mL
Polimixina B (Sigma, St Louis, EUA)	3.200 µg/mL	0,125 - 32 µg/mL

Tubos contendo 19 mL de ágar Müller-Hinton (MHA, Oxoid, Inglaterra), previamente esterilizados, foram fundidos e estabilizados em banho-maria entre 45 a 50°C. Uma vez estabilizada a temperatura, 1 mL da solução com a respectiva concentração de cada antimicrobiano foi adicionado ao tubo de ágar Müller-Hinton fundido. Após homogeneização, o conteúdo foi vertido em placas de Petri de 90 x 15 mm, descartáveis e pré-identificadas. As placas contendo os antimicrobianos foram utilizadas no mesmo dia.

Para cada amostra uma suspensão contendo aproximadamente 4 colônias, foi preparada em caldo de Müller-Hinton, e a turbidez ajustada a 0,5 na escala de McFarland. Para o teste de ágar diluição, a solução com inóculo a 0,5 na escala McFarland, foi diluída em água destilada estéril na proporção de 1:10 mL, resultando em um inóculo de aproximadamente 10^7 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/ mL. Duzentos microlitros desta suspensão bacteriana foi transferido para a base do inoculador de Steers de 52 pinos.

Desse modo, 1 a 2 µl de cada amostra foi inoculado na placa de Petri obtendo um inóculo final de 10⁴ UFC/mL (CLSI, 2006).

As placas foram deixadas à temperatura ambiente até a absorção do inóculo pelo ágar e, logo após, foram incubadas a 35 °C por 18 a 24 horas. Após o tempo de incubação determinado, as placas foram lidas e interpretadas de acordo com os critérios de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2006b).

A MIC foi definida como sendo a menor concentração de cada antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. A MIC₅₀ e a MIC₉₀ foram definidas como a concentração de antimicrobiano capaz de inibir 50% e 90% das amostras bacterianas testadas, respectivamente.

3.2.3. Concentração que previne o aparecimento de mutantes (MPC)

Com auxílio de uma alça bacteriológica, colônias de *Acinetobacter* spp. foram suspensas em 5 mL de caldo Müeller-Hinton (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra), para obter uma turvação bacteriana correspondente a 0,5 da escala de Mc Farland. A suspensão bacteriana foi homogeneizada e com o auxílio de um swab estéril o inóculo foi semeado de forma confluyente na superfície de 3 placas de ágar sangue, que foram incubadas por 18 a 24 horas a 37°C em condições aeróbias. A seguir, o conteúdo bacteriano das 3 placas de ágar sangue foi transferido para 100 mL de caldo Müeller-Hinton, e incubados por 18-20 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 5000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento

ressuspensão em aproximadamente 1 mL de caldo Müller-Hinton. Uma alíquota de 100 µl do sedimento, contendo um número igual ou superior a 10^{10} UFC/mL, foi semeado, com o auxílio da alça de *drigaslky*, em cada placa contendo a respectiva concentração de antibiótico e incubada a 35°C. A MPC foi determinada como a menor concentração de antimicrobiano capaz de prevenir o crescimento bacteriano, após 48 horas de incubação. Foram definidas como MPC₅₀ e MPC₉₀ as concentrações de antimicrobianos que previnem o surgimento de mutantes resistentes para 50% e 90% das amostras testadas, respectivamente (Blondeau *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2002a).

As preparações das soluções estoques e das placas com as diferentes concentrações de antimicrobianos seguiu os mesmos critérios da técnica de ágar diluição, porém houve elevação das concentrações finais para alguns antimicrobianos testados com exceção das fluoroquinolonas e da polimixina B (Tabela 4)

Tabela 4. Concentrações dos antimicrobianos testados para determinação das MPCs.

Antimicrobiano (Fonte)	Concentrações Testadas (MIC)	Concentrações Testadas (MPC)
Ceftazidima (Teuto, Anápolis, Brasil)	0,25-32 µg/mL	0,25-256 µg/mL
Cefepima (Bristol-Myers Squibb, Guayaquil, Equador)	0,25-32 µg/mL	0,25-256 µg/mL
Imipenem (Merck Sharp&Dohme, Elkton, EUA)	0,06-32 µg/mL	0,06-256 µg/mL
Meropenem (BioChimico, Rio de Janeiro, Brasil)	0,06-32 µg/mL	0,06-256 µg/mL
Ciprofloxacina (Fresenius Kabi, Tal Shirur, Índia)	0,03-32 µg/mL	0,03-32 µg/mL
Levofloxacina (Eurofarma, São Paulo, Brasil)	0,03-32 µg/mL	0,03-32 µg/mL
Gatifloxacina (Bristol-Myers Squibb, Illinois, EUA)	0,03-32 µg/mL	0,03-32 µg/mL
Polimixina B (Sigma, St Louis, EUA)	0,125 - 32 µg/mL	0,03-32 µg/mL

3.2.3.1. Contagem de colônias

O inóculo bacteriano da MPC deve possuir uma concentração bacteriana igual ou superior a 10^{10} UFC/mL, portanto para confirmação do inóculo bacteriano testado foi realizada uma contagem de colônias do sedimento de cada cultura bacteriana. Uma diluição seriada 1 para 10 foi realizada com o sedimento bacteriano utilizando-se solução salina a 0,85%. Vinte microlitros de cada diluição foi semeado em placa de ágar Mueller-Hinton em triplicata a qual foi incubada por 16 a 18 horas a 35-37°C. A contagem de colônias foi realizada apenas nas placas, onde o número de colônias ficou entre 6 e 60 UFC/mL. A contagem de colônias foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$C_c = 50 \times N \times D$$

Onde: C_c é a Contagem de colônias, N é o número de colônias contadas dividido por três (triplicata) e D: é a diluição; O número 50 é uma constante, pois é necessário fazer a correção para mL, já que é UFC/mL (20 μ l multiplicado por 50 μ l é igual a 1000 μ l) (Hernandes *et al.*, 2004)

3.2.3.2. Armazenamento das amostras mutantes

Foram armazenadas no Banco de Microrganismos do LEMC todas as amostras mutantes selecionadas no intervalo entre a MIC e a MPC, totalizando 527 amostras de *Acinetobacter* spp. As amostras foram armazenadas no freezer a -70°C em meio de cultura TSB suplementado com 15% de glicerol adicionado

ao respectivo antimicrobiano em concentrações subinibitórias, ou seja, uma diluição abaixo da MIC para o respectivo antimicrobiano.

3.2.3.3. Determinação da Janela para Seleção de Mutantes

Foi definida como a janela para seleção de mutantes o intervalo compreendido entre a MIC e a MPC. Com os resultados da MIC₅₀ e MIC₉₀ e da MPC₅₀ e MPC₉₀, para cada antimicrobiano testado, foi calculada então a razão entre a MPC e a MIC e determinada a janela para seleção de mutantes para 50% e 90% dos mutantes (Drlica, 2001).

3.2.3.4. Correlação entre MIC e MPC

Foi determinada a correlação entre MIC e MPC para os diversos agentes antimicrobianos entre as amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. utilizando-se regressão linear (r^2) como proposto por Drlica e colaboradores em 2006 (Drlica, 2006).

3.3 Detecção dos mecanismos de resistência

3.3.1. Taxa de hidrólise

Para quantificação da produção de β -lactamases foi realizada a mensuração da taxa de hidrólise dos β -lactâmicos por espectrofotometria dos extratos brutos de β -lactamase obtidos das amostras selvagem e mutantes (Bradford *et al.*, 1994; Livermore, 1995). Para extração do extrato bruto de β -lactamase, 5 colônias de cada uma das amostras foram inoculadas em 10 mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth) e incubadas por 12 horas a 35°C. Após este período, 0,5 mL desta cultura foi transferido para um novo tubo contendo 9,5

mL de TSB e incubado a 35°C por 4 horas adicionais. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi então desprezado e o centrifugado suspenso em 250 µl de acetato de sódio a 0,2 M, pH 5,5, e transferido para um tubo tipo eppendorf. Os tubos foram submetidos ao processo de congelamento e descongelamento rápido, por 4 vezes, utilizando-se um recipiente contendo gelo seco e o banho maria a 37°C, respectivamente. Após este processo, 250 µl de água estéril foi adicionado em cada um dos tubos, os quais ficaram incubados em gelo por 30 minutos. Durante este período, os tubos foram agitados com o auxílio do vortex a cada 10 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf. Para confirmação da extração das β-lactamases, de 1 a 10 µl de cada um dos extratos foi inoculado em uma placa de microdiluição contendo 20 µl de uma solução de nitrocefim 500 mM.

Para avaliar a taxa de hidrólise foi utilizado o programa de mecanismos enzimáticos, o qual avalia a absorbância da amostra *versus* o tempo, do espectrofotômetro Termo Spectronic (Fisher Scientific Company, Pensilvânia, EUA). Foi utilizado para o experimento, além do extrato bruto de β-lactamases, uma solução de meropenem 1 mM e ceftazidima 1 mM, cuja absorbância deveria variar entre 1300 e 1400 dA/min, e o tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. A absorbância das amostras foi lida durante 120 segundos. Resumidamente, uma cuveta contendo 900 µl do tampão fosfato e 100 µl do extrato bruto de β-lactamases foi utilizada para calibrar (“zerar”) o aparelho. A cuveta ensaio continha 800 µl do tampão fosfato e 100 µl do extrato bruto de β-lactamases,

que foi novamente utilizada para o ajuste da leitura. A seguir, 100 µl da solução do antimicrobiano a ser testado, meropenem ou ceftazidima, foi adicionada à cuveta e procedida a leitura da amostra. Uma unidade de atividade da betalactamase foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 nMol de substrato por minuto por mg de proteína. Comparando-se as taxas de hidrólise obtidas pela amostra selvagem *versus* amostra mutante, pode-se avaliar indiretamente se houve aumento da produção de enzimas ou não pela amostra mutante.

3.3.2 Avaliação do perfil das proteínas de membrana externa (OMPs)

A avaliação do perfil das proteínas da membrana externa foi realizada para as amostras selvagens e mutantes. A realização desta técnica nos permitem avaliar se houve a alteração do perfil de proteínas de membrana externa das amostras resistentes as cefalosporinas de amplo espectro, aos carbapenens e à polimixina B em relação as amostras selvagens sensíveis aos respectivos antimicrobianos.

A análise de proteínas de membrana externa (OMP) foi realizada de acordo com o método descrito por Filip e colaboradores (Filip *et al.*,1973). Com auxílio de uma alça estéril e em fluxo laminar, uma colônia bacteriana foi inoculada em 25 mL de caldo *brain heart infusion* (BHI, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e incubada sob leve agitação a 37°C por 18 a 20 horas. Após este período, em fluxo laminar, 25 mL desta cultura foi transferido para garrafas autoclaváveis contendo 200mL de BHI, as quais foram incubadas por 4 a 5

horas a 37°C. Em seguida as células bacterianas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente.

Após esta etapa as células bacterianas foram lavadas em 5 mL de Tris-HCl pH 8,0 30 mM e ressuspensas em 5 mL da mesma solução. Neste tampão, as amostras foram lisadas por sonicação (4 pulsos de 30 segundos cada) em sonicador (XL2000 Ultrasonic Cell Disruptor-Fisher Scientific International Inc.). Durante o processo de sonicação as amostras foram mantidas em gelo. Em seguida, as células lisadas foram centrifugadas a 8000 rpm por 25 minutos a 4°C para a remoção dos debris celulares. O sobrenadante foi submetido à ultracentrifugação a 38.200 rpm por 34 minutos a 4°C em ultracentrífuga Hitachi Himac CP85 β utilizando o rotor fixo P55AT (Hitachi Koki Corp., Tokio, Japão). Em seguida, o precipitado foi ressuspensão em 1mL de Tris-HCl 30mM pH 8,0 e 100 μ l de N-lauril-sarcosil a 20% foi adicionado para que as OMPs fossem precipitadas.

As amostras foram cuidadosamente homogeneizadas e mantidas à temperatura ambiente por 20 minutos. Foi então realizada uma nova etapa de ultracentrifugação a 38.200 rpm por 34 minutos a 22°C, e o precipitado contendo as OMP foi ressuspensão em 100 μ l de água deionizada. A quantificação das OMPs obtidas foi realizada através de ensaio espectrofotométrico no Termo Spectronic (Fisher Scientific Company, EUA) utilizando-se a técnica de Bradford (kit Bradford Die Concentrate - USB, EUA). Em um tubo de microcentrífuga, quantidades correspondentes a 20 μ g/mL de proteínas de cada uma das amostras foram adicionadas ao tampão de amostra de alta densidade e incubadas a 100°C por 10 minutos.

Em seguida as amostras e os padrões de peso molecular foram aplicadas no gel de dodecil sulfato de sódio (SDS), contendo 12% (pt/vol) de acrilamida (SDS-PAGE 12%). A eletroforese foi realizada a 40 volts por 20 horas no sistema V-16 Vertical Gel Electrophoresis System (Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD, EUA). Como padrão de peso molecular foram utilizados dois marcadores o *Rainbow coloured protein molecular weight markers* da Amersham Life Science (Amersham International plc, England) e o *protein molecular weight markers* da Sigma-Aldrich Corp. (St Louis, EUA). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado durante uma hora com coomassie blue R250 (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, EUA). Como descorante foi utilizado ácido acético a 10%. A análise do gel foi feita realizada com o programa Gel Doc – Quantity one (BioRad, Califórnia, EUA).

3.3.3 Avaliação dos mecanismos cromossômicos de resistência às quinolonas

3.3.3.1. PCR

Para determinação do mecanismo de resistência às quinolonas nas bactérias mutantes, foi realizada a amplificação das regiões determinantes de resistência às quinolonas (QRDR) dos genes *gyrA* e *parC* pela técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR).

Foram utilizados os seguintes iniciadores para:

- Gene *gyrA*, fita sentido 5' CCGTCGCGTACTTTACGC 3' e fita anti-sentido 5'CGTTCACCAGCAGGTTAG 3' [Georgiou *et al.*, 1996]

- Gene *parC*, fita sentido 5'TCTGAACTGGGCCTGAATG 3' e fita anti-sentido 5'CGTTCACCAGCAGGTTAG 3' [Georgiou *et al.*, 1996]

As condições de termociclagem foram as mesmas para ambos genes e consistiram de dez minutos a 95°C para o primeiro ciclo, seguidos por 35 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 58°C, três minutos a 72°C. As reações de amplificação das QRDR dos genes *gyrA* e *parC* originarão produtos com aproximadamente 384 e 344 pares de base, respectivamente.

3.3.3.1. Sequenciamento

Os produtos da PCR obtidos foram purificados a partir do gel de agarose com o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado utilizando o espectrofotômetro Biomate 5 UV-Visible (Termo Spectronic, Cambridge, Inglaterra) e, então, quantidades necessárias foram submetidas à reação preparatória para o seqüenciamento com o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Após o término da reação da PCR, o produto foi precipitado para a eliminação dos d-dNTPs marcados não incorporados à reação. Após a precipitação e lavagem com etanol, o produto foi ressuspenso em polímero TSR e colocado no aparelho ABI PRISM 310, *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Califórnia). As seqüências de DNA obtidas e as seqüências protéicas derivadas foram analisadas utilizando o programa *Lasergene Software Package* (DNASTAR, Madison, WI) e então submetidas a comparação com bases de dados genéticos disponíveis na internet (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

3.3.4. Quantificação da transcrição gênica

A quantificação da expressão dos genes que codificam ampC, sistema de bomba de efluxo e diminuição de proteínas de membrana externa foram avaliadas pela técnica da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e comparada com a expressão das amostras selvagens.

3.3.5. Extração de RNA e síntese de cDNA

Para extração e isolamento do RNA total, as amostras foram semeadas em placas contendo ágar McConkey (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, os isolados foram cultivados em 10 mL de caldo LB (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) a 37 °C sob agitação e o crescimento monitorado em espectrofotômetro até atingir o estágio médio da fase logarítmica de crescimento, correspondente a 1,5 a 2,0 unidades de absorbância a um comprimento de onda de 600nm ($DO_{600nm} = 0,5 - 0,6$). Foi adicionado a 0,5 mL de “RNAeasy Bacteria Protect Reagent” (Qiagen, Hilden, Alemanha) a uma alíquota de 0,25 mL da cultura, contendo $5,0 \times 10^8$ células em tubo de microcentrífuga e incubado durante cinco minutos após agitação vigorosa. Essa suspensão foi centrifugada por 10 minutos a $10.000 \times g$ e após este período o sobrenadante foi desprezado. O sedimento de células bacterianas foi armazenado a -20 °C até a execução da extração do RNA total. O isolamento de RNA total a partir do sedimento de células bacterianas das amostras estudadas foi processado com a utilização do “RNAeasy Mini Kit” de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, Hilden, Alemanha). Durante o processo de extração de RNA total as amostras foram tratadas com

desoxiribonuclease (DNase) para eliminar a possível contaminação residual com DNA bacteriano. Foi utilizado o kit “RNase-Free DNase Set”, seguindo as recomendações e instruções do fabricante (Qiagen, Hilden, Alemanha). O RNA total isolado foi eluído em 30 µl de água DEPC e sua concentração determinada em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), em contraste com água DEPC, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A quantificação de RNA de cada amostra foi estimada utilizando a correlação de 1 unidade de densidade óptica a 260 nm equivalente a 40 µg de RNA por mililitro de solução. A relação entre as unidades de absorbância a 260 e 280 nm ($A_{260}/280$) foi calculada para determinação da pureza da amostra de RNA, considerando valores aceitáveis em torno de 2,0. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose desnaturante (1,2% agarose, 6,7% de formaldeído, 200 mM de MOPS, 50 mM de acetato de sódio, 10 mM de EDTA, água DEPC) e visualizado em equipamento de foto documentação. Adicionalmente, foi realizada, para cada amostra de RNA total, uma PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores que amplificam uma seqüência do DNA ribossomal de eubactérias, com o intuito de confirmar a ausência de resíduos de DNA bacteriano contaminante na solução de RNA. Em fluxo laminar, uma solução-mãe foi preparada contendo master-mix (GoTaq[®] Green Master Mix, Promega, Madison, EUA), água estéril (Water, Molecular Biology Grade, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e o par de iniciadores que amplifica seqüência do DNA ribossomal 16S-8-F e 16S-1943-R na concentração final de 2 mM de cada oligonucleotídeo. A solução mãe foi mantida a aproximadamente 4°C durante seu preparo e, após leve agitação, 19 µl foi transferido para cada tubo de amplificação, que continha 1 µL da solução

de RNA a ser testada. As condições para amplificação foram de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos, 72°C por 30 segundos. A etapa de extensão final foi realizada por 10 minutos a 72°C. Após a ciclagem, a revelação do produto da PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,0% (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen, Carlsbad, EUA), seguida por visualização sob luz ultravioleta. A ausência de amplificação confirmava a ausência de DNA residual contaminante foi confirmada. A síntese de cDNA foi realizada através da reação de transcriptase reversa utilizando o “High-Capacity cDNA Archive Kit” seguindo as recomendações do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Uma reação contendo 5 µg de RNA total da amostra e os reagentes fornecidos pelo kit utilizado que correspondiam a 10 µl de tampão, 4 µl de dNTPs, 10 µl de oligonucleotídeos randômicos, 250 U da enzima transcriptase reversa e água destilada livre de nucleases q. s. p. 50 µl foi incubada a 25 °C por 10 minutos seguidos imediatamente por uma segunda etapa de incubação a 37 °C durante 120 minutos. O cDNA, produto da reação de transcriptase reversa, foi armazenado a -20 °C até o momento do seu processamento.

3.3.6. Reação da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)

A quantificação relativa da expressão dos genes estudados foi realizada pela técnica de qRT-PCR, cujo principio do método baseia-se na detecção da fluorescência no tubo de reação a medida que a dupla fita DNA é gerada. As seqüências dos iniciadores foram determinadas utilizando a versão do programa GeneFisher Interactive Primer Design, disponível na Internet (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/old.html>), de acordo com as seqüência dos genes em estudo, depositadas e publicadas na rede mundial de

computadores no GeneBank. As seqüências de oligonucleotídeos foram sintetizadas pela “Integrated DNA Technologies Inc.”(IDT, Coralville, EUA) e são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizado para quantificação da expressão gênica pela técnica da qRT-PCR.

Categoria	Gene	Seqüência do primer	
DNA ribossomal	16S	CAGCTCGTGTTCGTGAGATGT – F	
		CGTAAGGGCCATGATGACTT – R	
B-lactamase	AmpC	TGAGCTAGGTTCTGTTCAG – F	
		ACTTGTATACGTCGCGAG – R	
	33-36 kDa	GAAGCTGGTGCAATGTTG – F	
		TAGTGCCATCGATGTTGC – R	
OMPs	CarO	GCAATGGCAGATGAAGC – F	
	OmpA	TAAAGCACCCCGTAACC – R	
		CTCTTGCTGGCTTAAACG – F	
Efluxo	adeB	TGTGTGACCTTCGATACG – R	
		OmpW	TTAGCATCAGCAGGTTGG – F
		TATTGGTATCGGGGCAAC – R	
		GGATTATGGCGACAGAAGGA – F	
		AATACTGCCGCCAATACCAG – R	

As reações da PCR em tempo real para cada gene avaliado foram feitas em triplicada utilizando a mistura para PCR em tempo real “qRT-PCR Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG” (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Para amplificação dos respectivos genes, foi adicionado 2 µl da solução de cDNA da amostra bacteriana a 12,5 µl da mistura para qRT-PCR, 1 µl de cada par de oligonucleotídeos iniciadores a uma concentração de 10 µM e água DEPC q. s. p. 25 µl. As reações foram previamente incubadas no termociclador Eppendorf Mastercycler[®] Realplex4 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a 50°C

por 2 minutos, seguidos por mais 2 minutos a 95°C. As condições de termociclagem a seguir foram: 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C por 30 segundos, de acordo com as recomendações técnicas do fabricante. A curva de desnaturação (“melting curve”) foi determinada no final da termociclagem para se certificar que havia a presença de uma única seqüência de DNA, resultado da reação de amplificação.

3.3.7. Análise da expressão gênica

O gene ribossomal 16s RNA foi utilizado como gene endógeno para normalização da expressão dos genes alvos. A análise da expressão foi feita utilizando o software SDS V 2.0 (Applied Biosystems) pelo método Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$), onde a expressão normalizada (EN), o ΔCt , é calculado de acordo com a fórmula: $\Delta Ct = Ct \text{ (alvo)} - Ct \text{ (endógeno)}$.

A eficiência (E) de reação da amplificação dos genes estudados foi determinada de acordo com a fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, onde o “slope” representa o ângulo de inclinação da regressão linear das médias dos valores de Ct, observadas nas três reações de PCR em tempo real para as diluições seriadas da solução de cDNA das amostras selvagens. Para correção do cálculo da QR, a eficiência da reação de cada gene foi calculada pelo modelo Matemático descrito por Pfaffl utilizando o software SDS V2.0 (Pfaffl, 2001). O ΔCt dos genes pelas amostras foi calculada de acordo com os valores de Ct observados nas reações de qRT-PCR, realizadas em triplicata. A média da expressão normalizada (ΔCt) dos genes foi calculada a partir da diferença entre os valores de Ct do gene alvo e Ct do gene endógeno. A QR dos genes em

cada amostra mutante de *Acinetobacter* spp. foi calculada em relação à amostra selvagem (calibrador), a partir da diferença entre o ΔCt de cada gene da amostra e o ΔCt da amostra selvagem ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ da amostra - ΔCt do calibrador). Assim, o resultado da QR indica quantas vezes um gene é expresso em uma amostra em relação à expressão da amostra de referência utilizada (calibrador), utilizando a fórmula: $\text{QR} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

4 RESULTADOS

4. 1. Seleção das Amostras Bacterianas

Foram inicialmente testadas, pela técnica de disco difusão, 50 amostras de *Acinetobacter* spp. armazenadas no Banco de Microrganismo do LEMC da Universidade Federal de São Paulo/EPM. Estas amostras haviam sido coletadas de pacientes internados no Hospital São Paulo entre maio de 1993 e dezembro de 1999. Somente uma amostra por paciente foi incluída no estudo.

4.2. Determinação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos das amostras clínicas de *Acinetobacter* spp.

4.2.3. Técnica de Disco difusão

Para a seleção aleatória de 20 amostras de *Acinetobacter* spp. sensíveis a todos antimicrobianos testados, foram inicialmente avaliadas 50 amostras de *Acinetobacter* spp. pela técnica de disco-difusão, exceto para polimixina B pois não há padronização pelo CLSI para realização do teste de sensibilidade por essa técnica (CLSI, 2006a). Os resultados do teste de sensibilidade pela técnica de disco difusão estão apresentados no Anexo II. As amostras selecionadas para o estudo encontram-se destacadas na mesma.

4.2.3. Técnica de Ágar Diluição

A técnica de ágar diluição confirmou o perfil de sensibilidade das 20 amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. incluídas no estudo de acordo com os critérios de CLSI (CLSI, 2006b). Apenas uma única amostra apresentou resistência a polimixina B e os demais isolados foram sensíveis a todos antimicrobianos testados. Os resultados do teste de sensibilidade estão apresentados na Tabela 6.

A determinação das MIC₅₀ e MIC₉₀ para os diversos agentes antimicrobianos testados está apresentado na Tabelas 7.

A C₈-metoxi-quinolona, gatifloxacina (MIC₅₀, 0,06 µg/mL) foi o agente antimicrobiano testado mais potente contra as amostras de *Acinetobacter* spp. avaliadas. Esta quinolona foi duas vezes mais potente que imipenem e meropenem (MIC₅₀, 0,125 µg/mL). As cefalosporinas de amplo espectro, ceftazidima e cefepima (MIC₅₀, 4 µg/mL), apresentaram a mesma potência contra as amostras de *Acinetobacter* spp.

Com exceção de uma única amostra de *Acinetobacter* spp. que apresentou MIC para polimixina B de 4 µg/mL, todas amostras de *Acinetobacter* spp. avaliadas foram inibidas com concentração de polimixina B inferiores ou iguais a 2 µg/mL. A amostra com MIC de 4 µg/mL para polimixina B era sensível aos demais antimicrobianos avaliados.

Tabela 6. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos pela técnica de ágar diluição das amostras de *Acinetobacter* spp. de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2006b).

Número da Amostra	Agentes antimicrobianos - MIC ($\mu\text{g/mL}$)							
	Ceftazidima	Cefepima	Imipenem	Meropenem	Ciprofloxacina	Gatifloxacina	Levofloxacina	Polimixina B
30078	4	2	0,125	0,125	0,25	$\leq 0,03$	0,125	1
17069	4	1	0,125	0,125	0,06	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,5
17066	4	2	0,06	0,125	0,125	$\leq 0,03$	0,06	1
30053	4	2	0,06	0,125	0,25	0,06	0,125	1
17068	8	2	0,06	0,125	0,25	0,125	0,25	0,5
30076	4	4	0,125	0,125	0,125	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,5
146097	1	1	0,06	0,125	0,06	$\leq 0,03$	0,06	2
30062	4	4	0,125	0,25	0,25	$\leq 0,03$	0,125	4
146048	2	2	0,125	0,125	0,125	$\leq 0,03$	0,06	1
17043	4	4	0,06	0,25	0,125	0,06	0,06	0,5
146098	4	11	0,125	0,25	0,25	0,06	0,125	0,5
30035	8	8	0,125	0,25	0,25	0,125	0,125	2
58010	0,125	0,125	0,06	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,5
17071	8	8	0,06	0,25	0,25	0,06	0,125	0,25
58054	0,5	0,5	0,125	0,06	0,06	$\leq 0,03$	0,125	0,25
146054	4	4	0,125	0,25	0,5	0,125	0,25	2
30063	4	4	0,06	0,25	0,25	0,06	0,125	1
146055	4	4	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125	1
17086	4	4	0,125	0,25	0,25	0,06	0,06	0,5
30083	4	4	0,125	0,25	$\leq 0,03$	0,06	0,125	0,25

Tabela 7. Determinação das MIC₅₀ e MIC₉₀ para os diversos antimicrobianos pela técnica de ágar diluição das amostras de *Acinetobacter* spp. de acordo com as recomendações do CLSI (2006b).

Agentes Antimicrobianos	µg/mL	
	MIC ₅₀ ^a	MIC ₉₀ ^a
Ceftazidima	4	8
Cefepima	4	8
Imipenem	0,125	0,125
Meropenem	0,125	0,25
Polimixina	0,5	2
Ciprofloxacina	0,125	0,25
Levofloxacina	0,125	0,125
Gatifloxacina	0,06	0,125

a. MIC₅₀ e MIC₉₀, definidas como as concentrações inibitórias mínimas que inibem o crescimento de 50% e 90% das amostras testadas, respectivamente.

4.3. Determinação da Concentração que Previne o Aparecimento de Mutantes Resistentes dos Diversos Agentes Antimicrobianos entre as Amostras Clínicas de *Acinetobacter* spp.

A determinação da MPC das 20 amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. foi realizada para todos os antimicrobianos propostos no estudo.

Os resultados da quantificação da MPC para as amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. estão apresentados na Tabela 8. A determinação das MPC₅₀ e MPC₉₀ para os diversos antimicrobianos estão apresentados na Tabelas 9.

A MPC para a polimixina B apresentou valores até 32 µg/mL para 100% das amostras de *Acinetobacter* spp. testadas.

Entre os β-lactâmicos testados ceftazidima e cefepima apresentaram MPC₉₀ ≥ 256 µg/mL. Já para o imipenem, concentrações de 16 µg/mL foram capazes de inibir o crescimento de 100% dos isolados mutantes resistentes de *Acinetobacter* spp.

Entre as fluoroquinolonas, levofloxacina foi a quinolona que apresentou a menor MPC₅₀ (2 µg/mL), seguida pela gatifloxacina e ciprofloxacina.

Tabela 8. Avaliação da MPC dos diversos agentes antimicrobianos para as amostras de *Acinetobacter* spp.

Número da Amostra	Agentes antimicrobianos - MPC (µg/mL)							
	Ceftazidima	Cefepima	Imipenem	Meropenem	Ciprofloxacina	Gatifloxacina	Levofloxacina	Polimixina B
30078	256	256	4	8	>32	2	8	16
17069	64	>256	4	8	4	1	1	16
17066	256	>256	4	8	8	0,5	4	32
30053	256	>256	4	16	8	2	4	16
17068	64	32	0,125	16	4	1	2	16
30076	256	>256	8	16	32	2	8	32
146097	128	>256	0,5	0,5	4	0,5	2	16
30062	16	>256	8	8	2	2	2	16
146048	32	256	4	8	1	1	2	32
17043	16	8	0,25	2	1	4	2	4
146098	8	64	4	8	8	4	4	32
30035	16	128	4	8	4	4	8	32
58010	32	64	8	32	2	2	1	32
17071	256	256	2	16	8	0,5	1	8
58054	64	32	16	4	8	1	4	16
146054	256	256	4	16	32	4	16	16
30063	32	>256	8	8	0,5	0,5	2	16
146055	32	8	4	2	4	2	8	16
17086	256	>256	4	16	8	2	4	32
30083	64	64	4	8	8	2	4	32

Tabela 9. Determinação das MPC₅₀ e MPC₉₀ para os diversos antimicrobianos das amostras de *Acinetobacter* spp.

Agentes Antimicrobianos	µg/mL	
	MPC ₅₀ ^a	MPC ₉₀ ^a
Ceftazidima	64	>256
Cefepima	256	>256
Imipenem	4	8
Meropenem	8	16
Polimixina	16	32
Ciprofloxacina	4	32
Levofloxacina	2	4
Gatifloxacina	4	8

a. MPC₅₀ e MPC₉₀, definidas como as concentrações que previnem o aparecimento de mutantes de 50% e 90% das amostras testadas, respectivamente.

4.4. Determinação da janela para seleção de mutantes resistentes dos diversos agentes antimicrobianos testados contra as amostras de *Acinetobacter* spp.

A concentração de antimicrobiano sérica ou tecidual que se situa entre a MIC e a MPC para determinado microrganismo é definida como a janela para seleção de mutantes resistentes. Nesta faixa, haveria o maior favorecimento para a seleção e crescimento de bactérias mutantes resistentes. Na Tabela 10 foram determinadas as janelas dos diversos antimicrobianos avaliados neste estudo para as amostras de *Acinetobacter* spp. Como foi avaliado o grupo de bactérias pertencentes à mesma espécie, utilizou-se a relação MPC₅₀:MIC₅₀ para determinar qual agente teria a menor janela.

Entre as amostras de *Acinetobacter* spp, a ceftazidima foi a cefalosporina que apresentou a menor janela para a seleção de mutantes. Entre os carbapenens, o imipenem foi o agente que apresentou a melhor relação MPC₅₀:MIC₅₀. Entre as fluoroquinolonas, levofloxacina foi a quinolona testada que menos selecionou mutantes resistentes.

Polimixina B apresentou um grande intervalo que teoricamente favoreceria o crescimento de mutantes de *Acinetobacter* spp. resistentes.

Tabela 10. Determinação da janela para seleção de mutantes resistentes dos diversos agentes antimicrobianos entre as amostras clínicas de *Acinetobacter* spp.

Agente Antimicrobiano	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	MPC ₅₀ (µg/mL)	MPC ₉₀ (µg/mL)	MPC ₅₀ : MIC ₅₀ (µg/mL)	MPC ₉₀ : MIC ₉₀ (µg/mL)	C _{max} (µg/mL) ^a	Regime endovenoso
Ceftazidima	4	8	64	>256	16	>32	160	2g de 8/8h
Cefepima	4	8	256	>256	64	>32	130	2g de 8/8h
Imipenem	0,125	0,125	4	8	32	64	83	1g de 6/6h
Meropenem	0,125	0,25	8	16	64	64	134,4	1g de 8/8h
							15.000 a	
Polimixina B	0,5	2	16	32	32	16	8	25.000 UI/kg /dia
Ciprofloxacina	0,125	0,25	4	32	32	128	4,6	400 mg de 12/12h
Levofloxacina	0,125	0,125	2	4	16	32	6,4	500 mg/dia
Gatifloxacina	0,06	0,125	4	8	66,7	64	4,6	400 mg/dia

a. C_{max} (µg/mL) – Concentração sérica máxima atingida pelo agente antimicrobiano.

4.5. Determinação da relação entre MIC e MPC

Para avaliar a correlação entre a MIC e a MPC utilizamos o modelo de regressão linear, como mostra a Tabela 11.

Os resultados apresentados mostram que os valores de r^2 foram muito baixos (≤ 0.2), mostrando que não houve uma correlação entre a MIC e a MPC, ou seja o valor da MIC não poderia ser utilizado para predizer o valor da MPC.

Tabela 11. Correlação entre MIC e MPC para diversos antimicrobianos testados entre os isolados clínicos de *Acinetobacter* spp.

Agente antimicrobiano	r^2 para MPC/MIC
Ceftazidima	0.01
Cefepima	0.01
Imipenem	0.04
Meropenem	0.09
Ciprofloxacina	0.15
Levofloxacina	0.20
Gatifloxacina	0.19

4.6. Avaliação dos Mecanismos de Resistência das Amostras Mutantes

Para detecção dos mecanismos de resistência foram selecionadas somente 5 amostras de cada combinação espécie *versus* antimicrobiano, e para cada uma delas, foi detectado o mecanismo de resistência em uma amostra isolada no valor da MIC, uma amostra isolada no intervalo entre a MIC e a MPC, e outra isolada na concentração referente à MPC, quando possível. As amostras selecionadas para detecção dos mecanismos de resistência podem ser visualizadas na Tabela 12.

A seleção dessas amostras foi realizada de acordo com os resultados da MIC *versus* MPC, ou seja, foram selecionadas amostras que apresentaram maior janela para seleção de mutantes.

Tabela 12. Amostras selecionadas para detecção dos diferentes mecanismos de resistência.

Antimicrobiano	N°	N°	N°	N°	N°
	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
Ciprofloxacina	30078	17066	146098	17071	17069
Levofloxacina	30078	17066	146098	17071	17069
Gatifloxacina	30078	17066	146098	17071	17069
Moxifloxacina	30078	17066	146098	17071	17069
Ceftazidima	30078	17066	146098	30035	58054
Cefepima	30078	17066	146098	30035	58054
Imipenen	30078	17066	146098	30035	58054
Meropenem	30078	17066	146098	30035	58054
Polimixina B	30078	146097	17043	30083	58054

A Tabela 13 mostra a determinação das MICs e MPCs para as amostras de *Acinetobacter* spp. selecionadas para detecção dos mecanismos diversos de resistência avaliados no presente estudo.

Tabela 13. Valores das MICs e MPCs para as amostras seleccionadas para a detecção dos diferentes mecanismos de resistência.

Amostra	Ciprofloxacina MIC/MPC µg/mL	Levofloxacina MIC/MPC µg/mL	Gatifloxacina MIC/MPC µg/mL	Ceftazidima MIC/MPC µg/mL	Cefepime MIC/MPC µg/mL	Imipenem MIC/MPC µg/mL	Meropenem MIC/MPC µg/mL	Polimixina B MIC/MPC µg/mL
30078	0,257>32	0,125/ 8	≤ 0,03/ 2	4/ 256	2/ 256	0,125/4	0,125/ 8	1/ 16
17066	0,125/ 8	0,06/ 4	≤ 0,03/ 0,5	4/ 256	2/ >256	0,06/ 4	0,125/ 8	---
146097	---	---	---	---	---	---	---	2/ 16
146098	0,125/ 8	0,125/ 4	0,25/ 4	4/ 8	1/ 64	0,125/ 4	0,25/ 8	---
17043	---	---	---	---	---	---	---	0,5/ 4
17071	0,25/ 8	0,125/ 1	0,06/ 0,5	---	---	---	---	---
30035	---	---	---	8/ 16	8/ 128	0,125/ 4	0,25/8	---
30083	---	---	---	---	---	---	---	0,25/ 32
17069	0,06/ 4	≤ 0,03/1	≤ 0,03/1	---	---	---	---	---
58054	---	---	---	0,5/ 64	0,5/ 32	0,125/16	0,06/ 4	2/ 16

4.6.1. Avaliação da Produção de β -lactamases do Tipo AmpC

A Tabela 14 mostra a caracterização dos mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, onde podemos observar que em nenhum isolado de *Acinetobacter* spp. incluído no presente estudo foi detectada a expressão da β -lactamase do tipo ampC pela avaliação da taxa de hidrólise, ou seja, não foi observada a hidrólise para ceftazidima, cefepima e imipenem nem pelas amostras selvagens e nem pelas suas mutantes.

4.6.2. Avaliação do Perfil das Proteínas de Membrana Externa

Para os antimicrobianos β -lactâmicos e polimixina B foram realizadas a avaliação do perfil das proteínas de membrana externa para as amostras mutantes e selvagens. Como podemos visualizar nas Tabelas 14 e 15, não foi verificada nenhuma alteração na permeabilidade da membrana externa entre os mutantes avaliados para ambas as classes de antimicrobianos.

A Figura 4 mostra o perfil das proteínas de membrana externa para uma amostra de *Acinetobacter* spp. selecionadas na presença de ceftazidima.

Tabela 14. Caracterização dos mecanismos de resistência ao β -lactâmicos para isolados clínicos de *Acinetobacter* spp.

Amostra	Permeabilidade de membrana externa^a	Expressão de AmpC (Taxa de hidrólise)
Ceftazidima		
30078 (selvagem)		
30078 (4 $\mu\text{g/mL}$)	Sem alteração	Não detectada
30078 (256 $\mu\text{g/mL}$)	Sem alteração	Não detectada
17066 (selvagem)		
17066 (4 $\mu\text{g/mL}$)	Sem alteração	Não detectada
17066 (256 $\mu\text{g/mL}$)	Sem alteração	Não detectada
146098 (selvagem) ^b		
146098 (4 $\mu\text{g/mL}$)	Sem alteração	Não detectada
30035 (selvagem) ^b		
30035 (8 $\mu\text{g/mL}$)	Sem alteração	Não detectada
58054 (selvagem)		
58054 (0,5 $\mu\text{g/mL}$)	Sem alteração	Não detectada
58054 (32 $\mu\text{g/mL}$)	Sem alteração	Não detectada
Cefepima		
30078 (selvagem)		
30078 (2 $\mu\text{g/mL}$)	Sem alteração	Não detectada
30078 (256 $\mu\text{g/mL}$)	Sem alteração	Não detectada
17066 (selvagem)		
17066 (2 $\mu\text{g/mL}$)	Sem alteração	Não detectada
17066 (256 $\mu\text{g/mL}$)	Sem alteração	Não detectada
146098 (selvagem)		

146098 (2 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
146098 (32 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
<hr/>		
30035 (selvagem)		
30035 (4 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
30035 (64 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
<hr/>		
58054 (selvagem)		
58054 (0,5 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
58054 (16 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
<hr/>		
Imipenem		
<hr/>		
30078 (selvagem)		
30078 (0,125 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
30078 (4 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
<hr/>		
17066 (selvagem)		
17066 (0,06 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
17066 (4 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
<hr/>		
146098 (selvagem)		
146098(0,125 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
146098 (2 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
<hr/>		
30035 (selvagem)		
30035 (0,125 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
30035 (2 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
<hr/>		
58054 (selvagem)		
58054 (0,125 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
58054 (8 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
<hr/>		
Meropenem		
<hr/>		
30078 (selvagem)		
30078 (0,125 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada

30078 (4 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
<hr/>		
17066 (selvagem)		
17066 (0,125 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
17066 (4 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
<hr/>		
146098 (selvagem)		
146098 (0,25 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
146098 (4 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
<hr/>		
30035 (selvagem)		
30035 (0,25 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
30035 (4 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
<hr/>		
58054 (selvagem)		
58054 (0,06 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada
58054 (2 µg/mL)	Sem alteração	Não detectada

- a. Alterações das proteínas de membrana externa das amostras mutantes em comparação àquelas das amostras selvagens;
- b. A amostra mutante apresentou o valor da MPC igual ao valor da MIC.

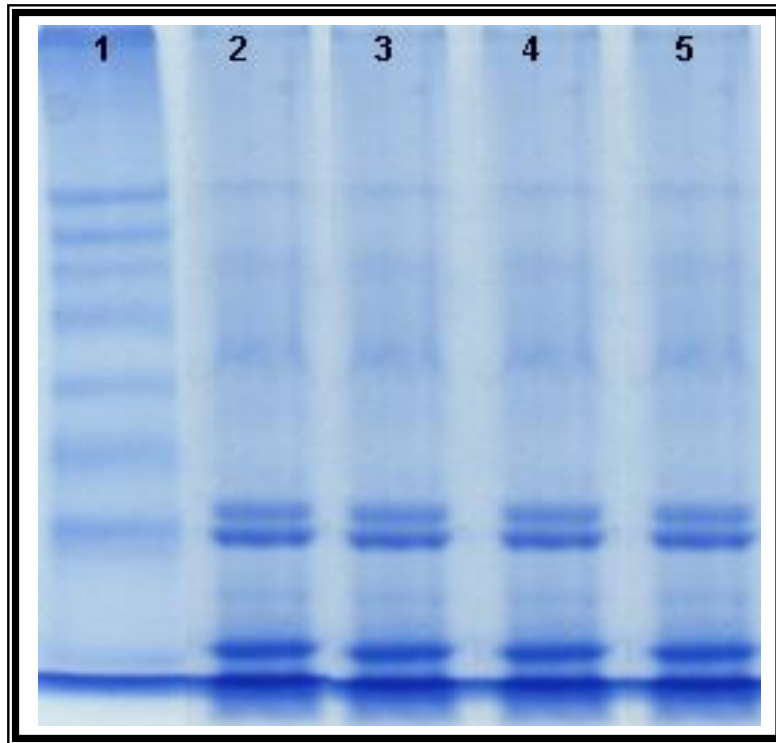


Figura 4 – Perfil das proteínas de membrana externa das amostras de *Acinetobacter* spp. selecionadas com ceftazidima.

Linha 1, padrão de alto peso molecular; linha 2, amostra selvagem de *Acinetobacter* spp.; linha 3, amostra mutante de *Acinetobacter* spp. (MPC, 4 $\mu\text{g/mL}$); linha 4, amostra mutante de *Acinetobacter* spp. (MPC, 32 $\mu\text{g/mL}$); linha 5, amostra mutante de *Acinetobacter* spp. (MPC, 256 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 15. Caracterização dos mecanismos de resistência à polimixina B entre as amostras de *Acinetobacter* spp.

Amostra	Permeabilidade de membrana externa
30078 (selvagem)	
30078 (1 µg/mL)	Sem alteração
30078 (8 µg/mL)	Sem alteração
146097 (selvagem)	
146097 (2 µg/mL)	Sem alteração
146097 (8 µg/mL)	Sem alteração
17043 (selvagem)	
17043 (0,5 µg/mL)	Sem alteração
17043 (2 µg/mL)	Sem alteração
30083 (selvagem)	
30083 (0,25 µg/mL)	Sem alteração
30083 (16 µg/mL)	Sem alteração
58054 (selvagem)	
58054 (0,25 µg/mL)	Sem alteração
58054 (8 µg/mL)	Sem alteração

a. Alterações das proteínas de membrana externa das amostras mutantes em comparação àquelas das amostras selvagens;

Para detecção do mecanismo de resistência às fluoroquinolonas foi realizada a amplificação seguida pelo sequenciamento das regiões QNDR dos genes *gyrA* e *parC*. Entretanto não foi detectada nenhuma mutação entre as amostras de *Acinetobacter* spp. avaliadas no presente estudo (Tabela 16).

Tabela 16. Detecção da mutação nos genes *gyrA* e *parC* em isolados de *Acinetobacter* spp. testadas contra fluoroquinolonas.

Amostra	Detecção da mutação	
	<i>gyr A</i>	<i>parC</i>
Ciprofloxacina		
30078 (selvagem)	Sem mutação	Sem mutação
30078 (0,25 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
30078 (32 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17066 (selvagem)		
17066 (0,125 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17066 (4 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
146098 (selvagem)		
146098 (0,25 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
146098 (4 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17071 (selvagem)		
17071 (0,25 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17071 (4 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17069 (selvagem)		
17069 (0,06 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17069 (2 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
Gatifloxacina		
30078 (selvagem)	Sem mutação	Sem mutação
30078 (0,03 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação

30078 (1 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17066 (selvagem)	Sem mutação	Sem mutação
17066 (0,03 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17066 (0,25 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
146098 (selvagem)	Sem mutação	Sem mutação
146098 (0,06 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
146098 (2 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17071 (selvagem)	Sem mutação	Sem mutação
17071 (0,06 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17071 (0,25 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17069 (selvagem)	Sem mutação	Sem mutação
17069 (0,03 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17069(0,5 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
Levofloxacina		
30078 (selvagem)	Sem mutação	Sem mutação
30078 (0,125 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
30078 (4 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17066 (selvagem)	Sem mutação	Sem mutação
17066 (0,06 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17066 (2 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
146098 (selvagem)	Sem mutação	Sem mutação
146098 (0,125 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
146098 (2 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17071 (selvagem)	Sem mutação	Sem mutação
17071 (0,125 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17071 (0,5 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação

17069 (selvagem)	Sem mutação	Sem mutação
17069 (0,03 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação
17069 (0,5 µg/mL)	Sem mutação	Sem mutação

4.7. PCR em Tempo Real

Para avaliação dos mecanismos de resistência pela técnica da qRT-PCR foram selecionadas 5 amostras de *Acinetobacter* spp. e suas respectivas amostras mutantes resistentes como podem ser visualizadas na Tabela 17. Como a amostra selvagem foi utilizada como calibradora da reação optamos por avaliar apenas cinco amostra daquelas avaliadas anteriormente.

Tabela 17. Amostras de *Acinetobacter* spp. selecionadas para análise da transcrição gênica pela técnica da qRT-PCR para avaliação de diversos mecanismo de resistência.

	30078		17066		17069		58054		146098	
Antimicrobiano	MIC	MPC	MIC	MPC	MIC	MPC	MIC	MPC	MIC	MPC
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Ceftazidima	4	256	4	32	1	64	0,5	32	4	32
Cefepima	4	128	2	16	1	256	0,5	16	4	32
Imipenem	0,125	2	0,06	0,125	0,25	256	0,125	8	0,125	2
Meropenm	0,125	4	0,125	8	0,125	0,25	0,25	2	0,125	4
Ciprofloxacina	0,25	32	0,25	2	0,125	2	0,06	4	0,03	2
Gatifloxacina	0,03	1	0,125	1	0,03	0,25	0,06	0,5	0,06	1
Levofloxacina	0,125	4	0,25	1	0,06	1	0,125	4	0,125	2
Polimixina B	1	8	1	8	2	8	0,25	8	0,25	16

Dentre as amostras selvagens apenas a 17069, não estava viável, portanto esta e suas respectivas mutantes foram excluída do estudo, uma vez que utilizamos a amostra selvagem como calibradora da reação (nível zero), não haveria com quem comparar as suas amostras mutantes resistentes. As

amostras de *Acinetobacter* spp. que encontram-se em destaque na Tabela 18 não obtiveram crescimento após serem cultivadas diversas vezes em ágar sangue, ou seja não foi possível recuperá-las, portanto essas amostras foram excluídas do estudo.

Para avaliação da resistência aos β -lactâmicos avaliamos a expressão gênica da β -actamase do tipo AmpC e a diminuição da expressão da proteína de membrana externa ompA.

A expressão da proteína de membrana externa CarO também tem sido associada à resistência aos carbapenens e dessa maneira também foi avaliada pela técnica da qRT-PCR.

Outro mecanismo de resistência que vem sendo amplanemente descrito e também avaliado neste estudo foi a expressão do sistema de efluxo AdeABC.

Para avaliação do mecanismo de resistência a polimixina B foi avaliada a expressão da proteína de membrana externa OmpW, que recentemente foi descrita em mutantes de *A. baumannii* resistentes à polimixina (Vila *et al.*, 2007).

Para realização dos experimentos foi realizado anteriormente a padronização da técnica da qRT-PCR, assim foi estabelecido as quantidades específicas de cada primer e cDNA para a quantificação relativa dos mecanismos de resistência. Foi utilizada a cepa de *Acinetobacter* spp. ATCC 17978 para realização da padronização da qRT-PCR.

Todos os genes de resistência descritos acima foram avaliados pela técnica da qRT-PCR para todas as amostras de *Acinetobacter* spp. descrita na Tabela 17.

Como podemos observar nas figuras abaixo cada amostra de *Acinetobacter* spp. apresentou comportamentos distintos quando avaliamos os mecanismos de resistência frente aos mesmos antimicrobianos.

Na detecção da β -lactamase do tipo AmpC, a amostra selvagem (30078) produziu AmpC em nível basal (zero), quando comparamos com as amostras mutantes podemos verificar que houve um aumento da expressão dessa enzima para as amostras selecionadas com gatifloxacina, imipenem e meropenem (Figura 5).

O antimicrobiano que apresentou a maior expressão de β -lactamase do tipo AmpC foi o mutante de meropenem, portanto, observa-se que quando comparamos a amostras selvagem 30078 com as respectivas amostras mutantes de meropenem (meropenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$ e meropenem 8 $\mu\text{g/mL}$) verificamos que quanto maior a concentração de meropenem maior foi a expressão dessa β -lactamase.

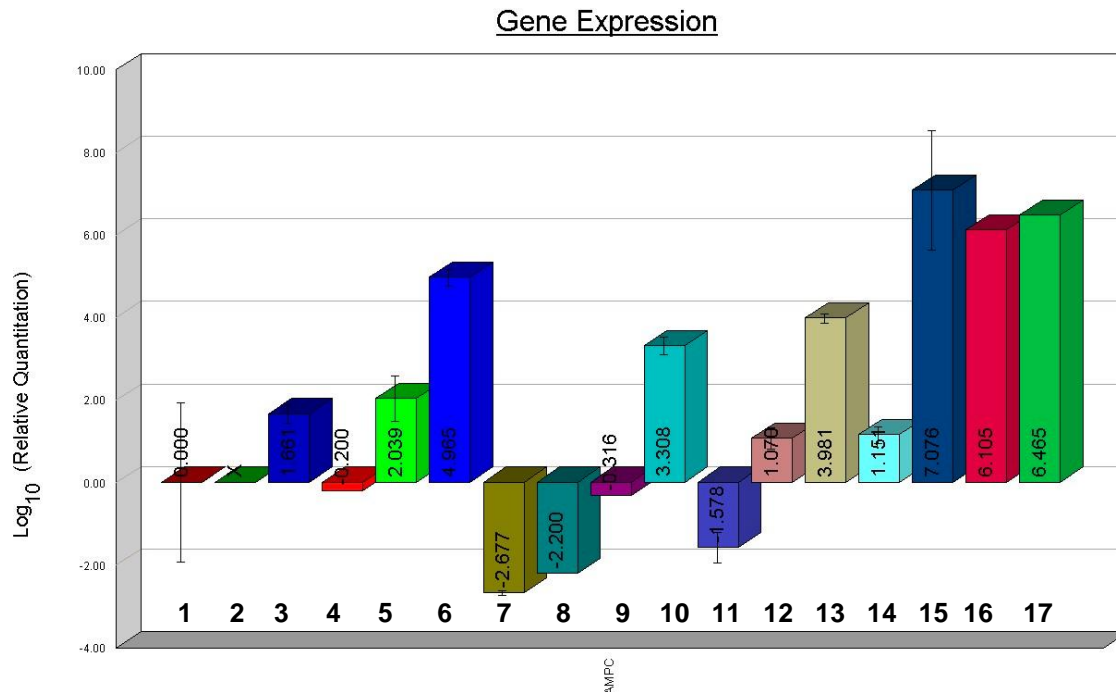


Figura 5. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica β -lactamase do tipo AmpC para amostra 30078 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 3007. Amostras mutantes selecionadas com: 2: (ciprofloxacina 0,25 $\mu\text{g/mL}$), 3: (ciprofloxacina >32 $\mu\text{g/mL}$), 4: (gatifloxacina <0,03 $\mu\text{g/mL}$), 5: (gatifloxacina 2 $\mu\text{g/mL}$), 6: (levofloxacina 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 7: (levofloxacina 8 $\mu\text{g/mL}$), 8: (ceftazidima 4 $\mu\text{g/mL}$), 9: (ceftazidima >256 $\mu\text{g/mL}$), 10: (cefepima 2 $\mu\text{g/mL}$), 11: (cefepima 256 $\mu\text{g/mL}$), 12: (imipenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 13: (imipenem 4 $\mu\text{g/mL}$), 14: (meropenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 15: (meropenem 8 $\mu\text{g/mL}$), 16: (polimixina B 1 $\mu\text{g/mL}$) e 17: (polimixina B 8 $\mu\text{g/mL}$).

Outro mecanismo de resistência avaliado foi a expressão de bomba de efluxo AdeB. Para a amostra 30078 podemos visualizar na Figura 6 que não foi possível detectar a expressão da bomba de efluxo para a maioria das amostras mutantes resistentes. Entretanto, gatifloxacina apresentou o aumento da expressão dessa bomba de efluxo, uma vez que para o mutante de gatifloxacina

<0,03 µg/mL não foi detectada a expressão da transcrição desse gene e o mutante da gatifloxacina 2 µg/mL aumentou aproximadamente 5 vezes mais que a mutante da MIC.

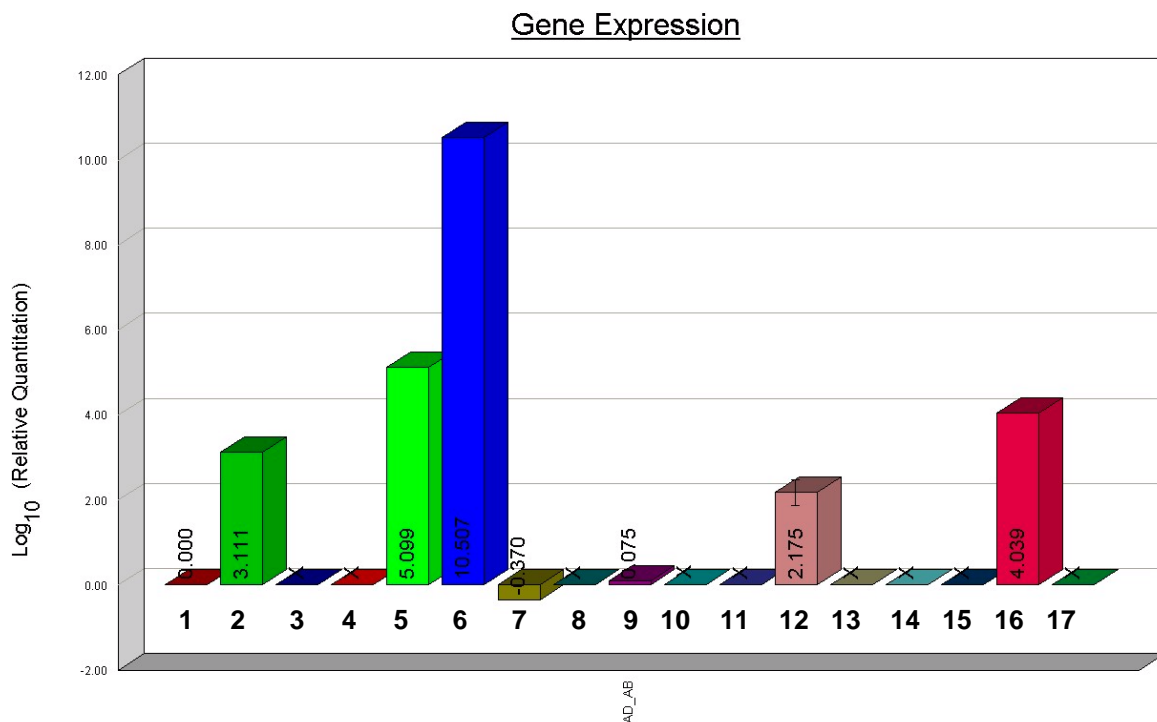


Figura 6. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica o sistema de bomba de efluxo AdeB para amostra 30078 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 30078. Amostras mutantes selecionadas com: 2: (ciprofloxacina 0,25 µg/mL), 3: (ciprofloxacina >32 µg/mL), 4: (gatifloxacina <0,03 µg/mL), 5: (gatifloxacina 2 µg/mL), 6: (levofloxacina 0,125 µg/mL), 7: (levofloxacina 8 µg/mL), 8: (ceftazidima 4 µg/mL), 9: (ceftazidima >256 µg/mL), 10: (cefepima 2 µg/mL), 11: (cefepima 256 µg/mL), 12: (imipenem 0,125 µg/mL), 13: (imipenem 4 µg/mL), 14: (meropenem 0,125 µg/mL), 15: (meropenem 8 µg/mL), 16: (polimixina B 1 µg/mL) e 17: (polimixina B 8 µg/mL).

De acordo com o resultado da expressão da proteína de membrana externa CarO para a amostra de *Acinetobacter* spp. 30078, pode-se observar que

os mutantes resistentes de meropenem, apresentaram uma diminuição na expressão dessa proteína, o que poderia ter contribuído para a redução da entrada desses antimicrobianos na célula bacteriana (Figura 7).

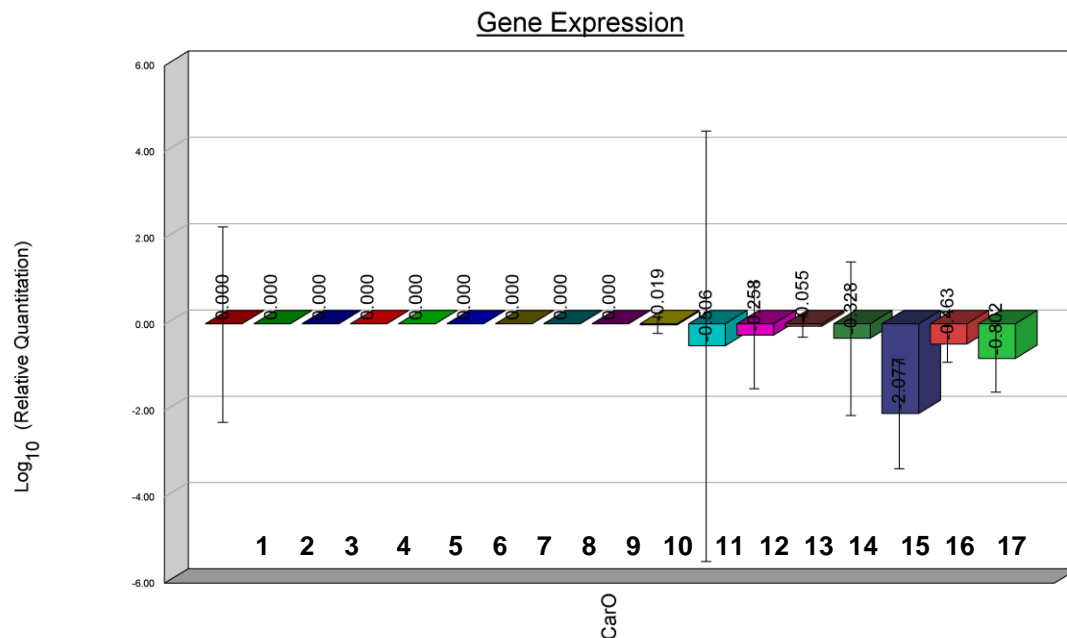


Figura 7. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa CarO para amostra 30078 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 30078. Amostras mutantes selecionadas com: 2: (ciprofloxacina 0,25 µg/mL), 3: (ciprofloxacina >32 µg/mL), 4: (gatifloxacina <0,03 µg/mL), 5: (gatifloxacina 2 µg/mL), 6: (levofloxacina 0,125 µg/mL), 7: (levofloxacina 8 µg/mL), 8: (ceftazidima 4 µg/mL), 9: (ceftazidima >256 µg/mL), 10: (cefepima 2 µg/mL), 11: (cefepima 256 µg/mL), 12: (imipenem 0,125 µg/mL), 13: (imipenem 4 µg/mL), 14: (meropenem 0,125 µg/mL), 15: (meropenem 8 µg/mL), 16: (polimixina B 1 µg/mL) e 17: (polimixina B 8 µg/mL).

Na Figura 8, pode ser observado que a proteína de membrana externa OmpA apresentou diminuição na sua expressão apenas para os antimicrobianos cefepima, imipenem e meropenem para a amostra de *Acinetobacter* spp. 30078.

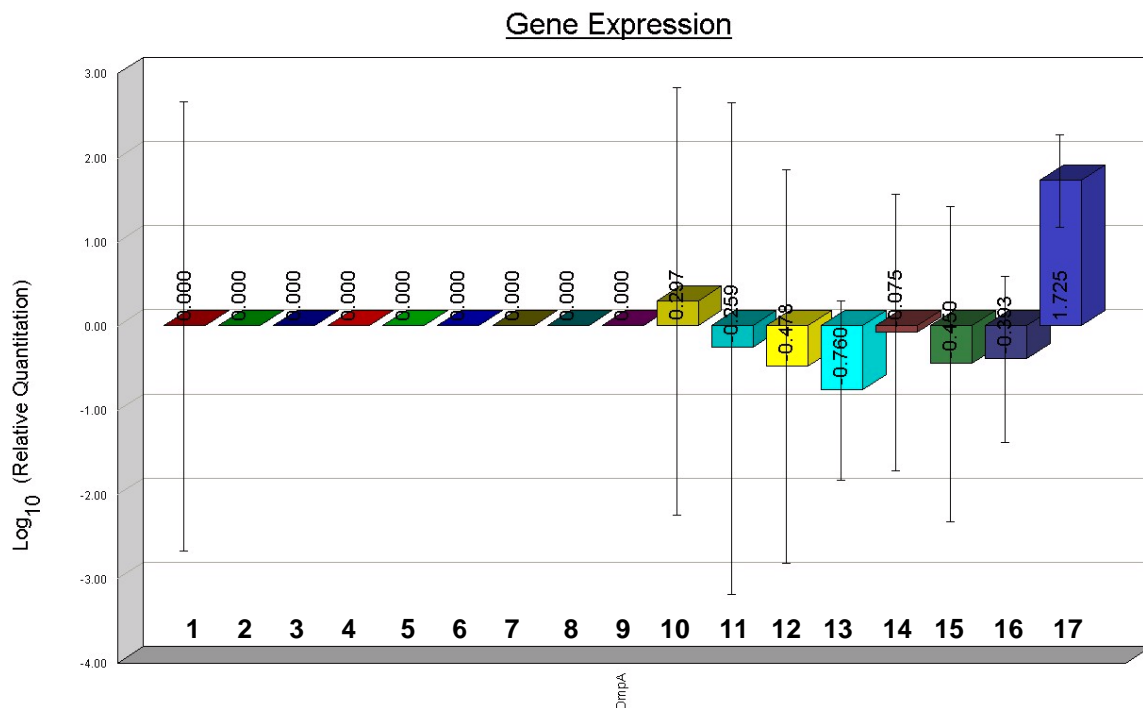


Figura 8. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa OmpA para amostra 30078 de *Acinetobacter* spp. Legenda: 1: amostra selvagem 30078. Amostras mutantes selecionas com: 2: (ciprofloxacina 0,25 µg/mL), 3: (ciprofloxacina >32 µg/mL), 4: (gatifloxacina <0,03 µg/mL), 5: (gatifloxacina 2 µg/mL), 6: (levofloxacina 0,125 µg/mL), 7: (levofloxacina 8 µg/mL), 8: (ceftazidima 4 µg/mL), 9: (ceftazidima >256 µg/mL), 10: (cefepima 2 µg/mL), 11: (cefepima 256 µg/mL), 12: (imipenem 0,125 µg/mL), 13: (imipenem 4 µg/mL), 14: (meropenem 0,125 µg/mL), 15: (meropenem 8 µg/mL), 16: (polimixina B 1 µg/mL) e 17: (polimixina B 8 µg/mL).

Para a avaliação da transcrição gênica da proteína de membrana externa OmpW observamos a diminuição da transcrição para os carbapenems, imipenem e meropenem, como pode ser visualizado na Figura 9.

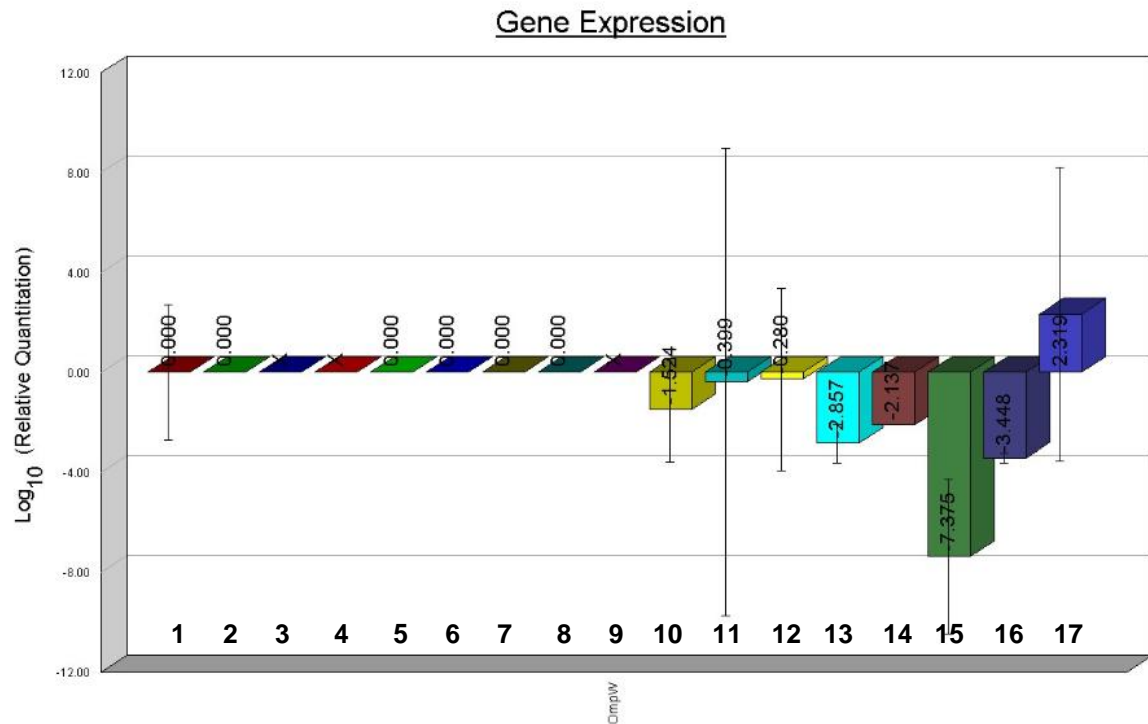


Figura 9. Quantificação relativa expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa OmpW para amostra 30078 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 30078. Amostras mutantes selecionadas com: 2: (ciprofloxacina 0,25 µg/mL), 3: (ciprofloxacina >32 µg/mL), 4: (gatifloxacina <0,03 µg/mL), 5: (gatifloxacina 2 µg/mL), 6: (levofloxacina 0,125 µg/mL), 7: (levofloxacina 8 µg/mL), 8: (ceftazidima 4 µg/mL), 9: (ceftazidima >256 µg/mL), 10: (cefepima 2 µg/mL), 11: (cefepima 256 µg/mL), 12: (imipenem 0,125 µg/mL), 13: (imipenem 4 µg/mL), 14: (meropenem 0,125 µg/mL), 15: (meropenem 8 µg/mL), 16: (polimixina B 1 µg/mL) e 17: (polimixina B 8 µg/mL).

A segunda amostra de *Acinetobacter* spp. avaliada foi a 17068, onde podemos observar na Figura 10 que não detectamos a presença da β -lactamase do tipo AmpC em nenhum dos mutantes resistentes avaliados para esta amostra.

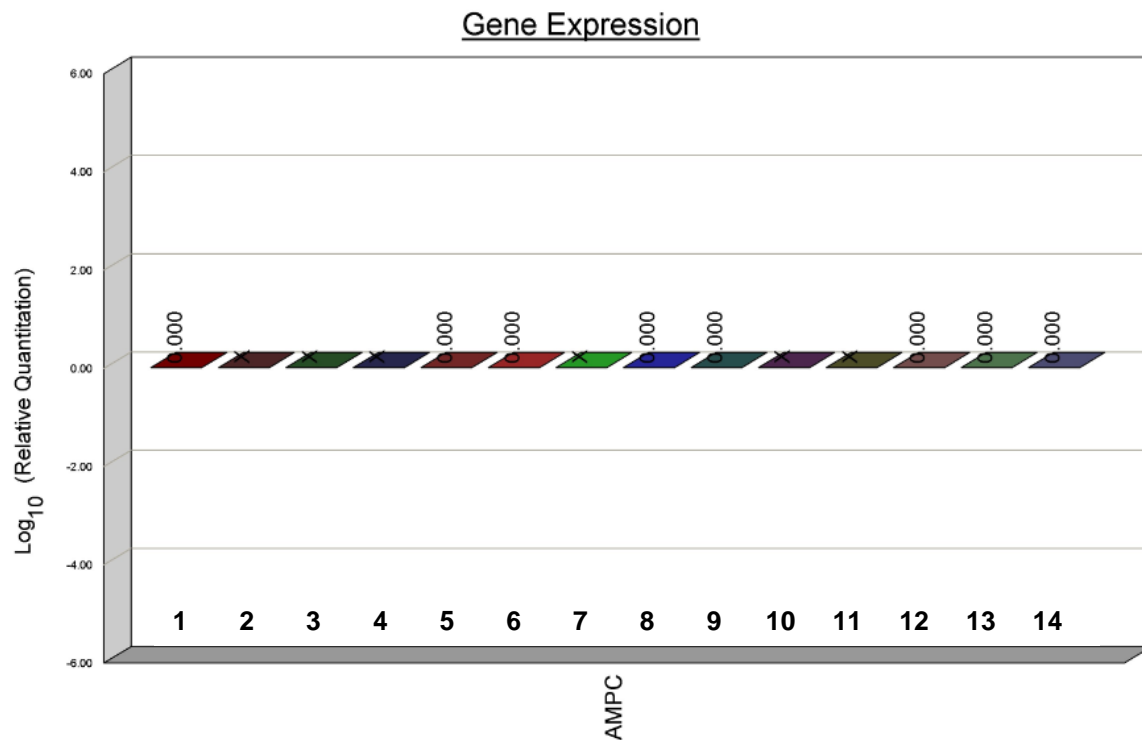


Figura 10. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica β -lactamase do tipo AmpC para amostra 17066 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 17066 Amostra mutante selecionada com: 2: (meropenem 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 3: (levofloxacina 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4: (levofloxacina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5: (imipenem 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 6: (imipenem 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 7: (gatifloxacina 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 8: (gatifloxacina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 9: (cefepima 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 10: (cefepima 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 11: (ciprofloxacina 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 12: (ciprofloxacina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 13: (ceftazidima 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 14: (ceftazidima 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Assim como a detecção de AmpC, o mesmo aconteceu para detecção da bomba de efluxo AdeB, ou seja, não foi possível detectar esse mecanismo de resistência para nenhum dos mutantes resistentes avaliados referente a esta amostra, como mostra a Figura 11

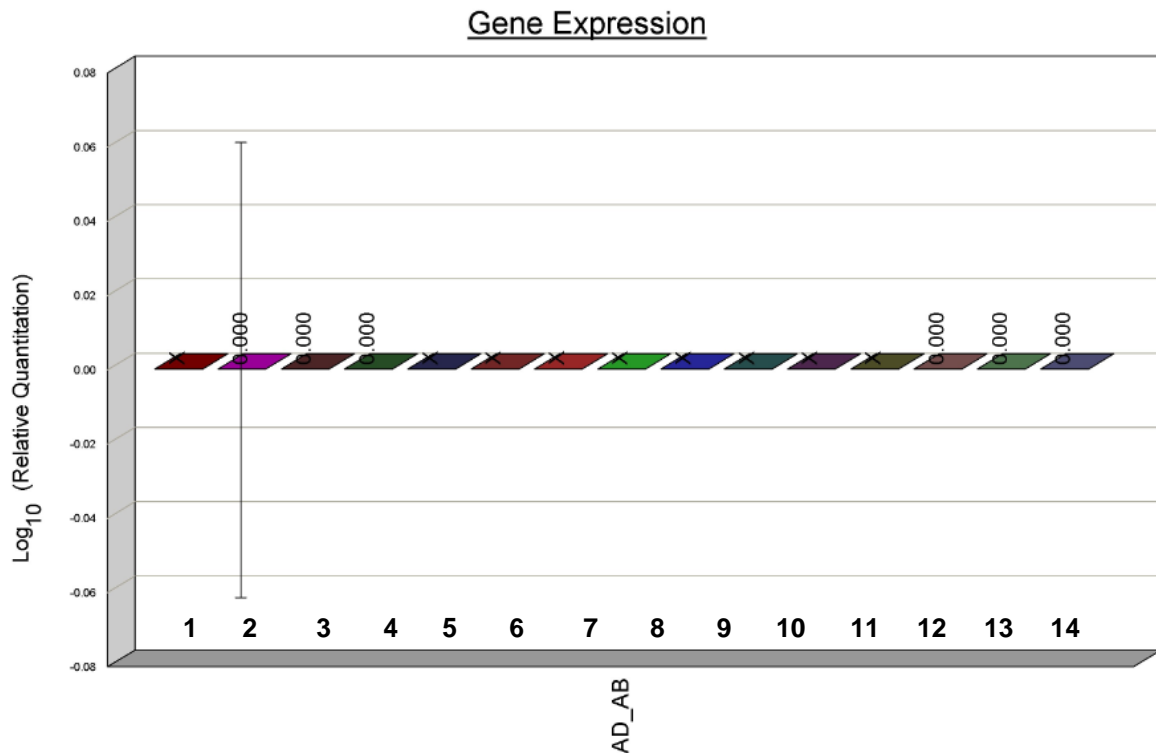


Figura 11. Quantificação relativa expressão do gene que codifica o sistema de bomba de efluxo AdeB para amostra 17066 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 17066. Amostra mutante selecionada com: 2: (meropenem 0,125 µg/mL), 3: (levofloxacina 0,25 µg/mL), 4: (levofloxacina 1 µg/mL), 5: (imipenem 0,06 µg/mL), 6: (imipenem 0,125 µg/mL), 7: (gatifloxacina 0,125µg/mL), 8: (gatifloxacina 1 µg/mL), 9: (cefepima 0,06 µg/mL), 10: (cefepima 2 µg/mL), 11: (ciprofloxacina 0,25 µg/mL), 12: (ciprofloxacina 2 µg/mL), 13: (ceftazidima 4 µg/mL), 14: (ceftazidima 32 µg/mL).

Para análise da expressão da proteína de membrana externa CarO podemos verificar na Figura 12 que essa proteína esta sendo expressa em diversos mutantes, mas por outro lado quando comparamos com a amostra selvagem (nível zero), nenhuma das amostras mutantes resistentes foram capazes que expressar essa proteína menos que a selvagem. Porém, nos mutantes de ciprofloxacina e ceftazidima foi observado um aumento na expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa CarO, entretanto ceftazidima obteve uma concentração 7,6 vezes maior quando comparada com a amostra selvagem.

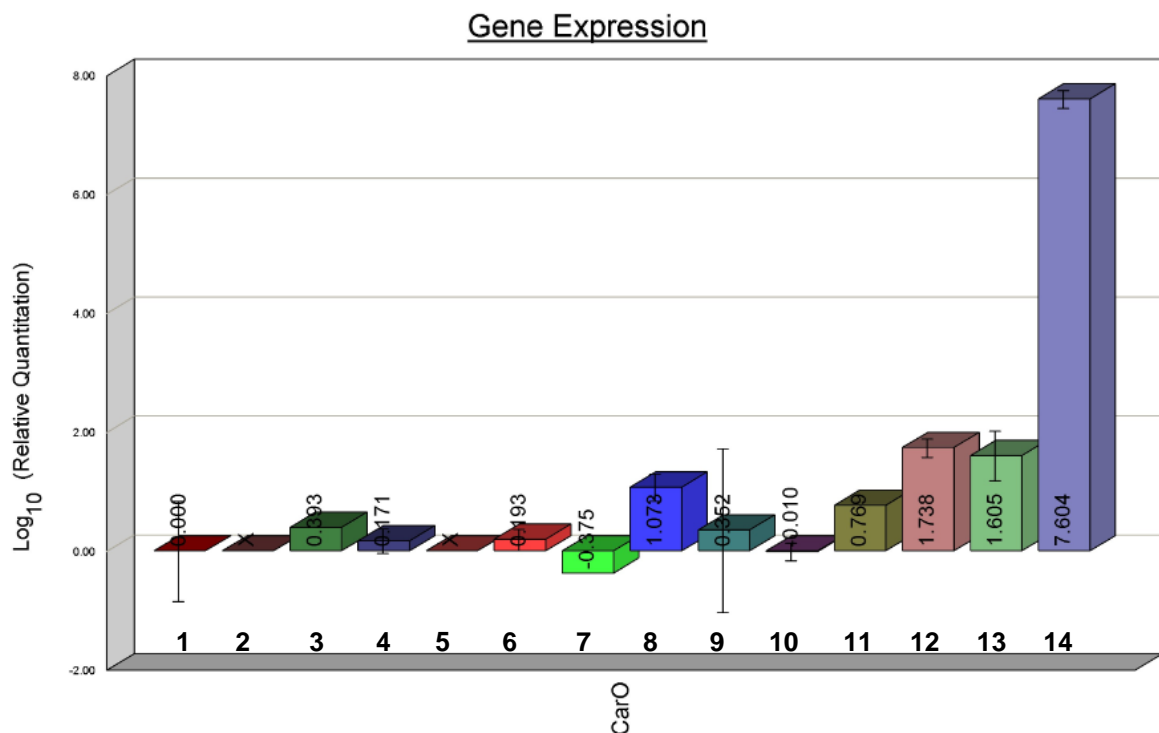


Figura 12. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa CarO para amostra 17066 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 17066. Amostra mutante selecionada com: 2: (meropenem 0,125 µg/mL), 3: (levofloxacina 0,25 µg/mL), 4: (levofloxacina 1 µg/mL), 5: (imipenem 0,06 µg/mL), 6: (imipenem 0,125 µg/mL), 7: (gatifloxacina 0,125µg/mL), 8: (gatifloxacina 1 µg/mL), 9: (cefepima 0,06 µg/mL), 10: (cefepima

2 $\mu\text{g/mL}$), 11: (ciprofloxacina 0,25 $\mu\text{g/mL}$), 12: (ciprofloxacina 2 $\mu\text{g/mL}$), 13: (ceftazidima 4 $\mu\text{g/mL}$), 14: (ceftazidima 32 $\mu\text{g/mL}$).

Assim como acabamos de mostrar anteriormente, a expressão da proteína de membrana externa OmpA apresentou desempenho semelhante com a encontrada pela CarO, ou seja, os mutantes estão expressando essa proteína de membrana externa uma vez que o esperado era encontrar uma diminuição dessa expressão nos mutantes resistentes quando comparados com a amostra selvagem (Figura 13).

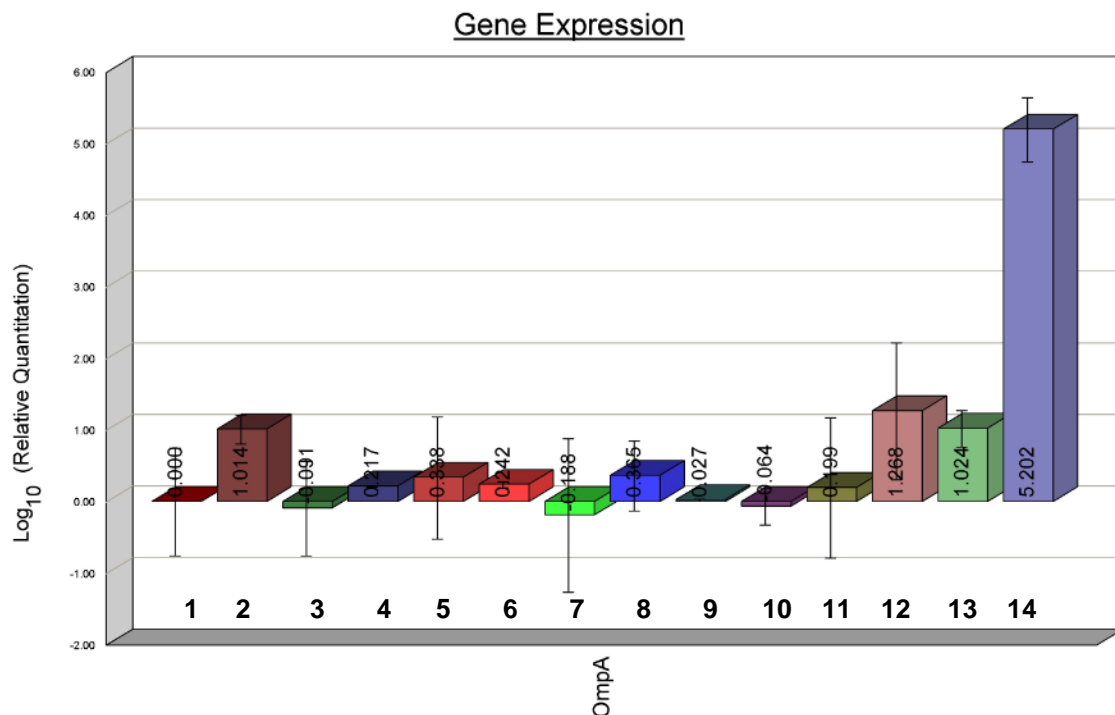


Figura 13. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa OmpA para amostra 17066 de *Acinetobacter* spp. Legenda: 1: amostra selvagem 17066. Amostra mutante selecionada com: 2: (meropenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 3: (levofloxacina 0,25 $\mu\text{g/mL}$), 4: (levofloxacina 1 $\mu\text{g/mL}$), 5: (imipenem 0,06 $\mu\text{g/mL}$), 6: (imipenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 7: (gatifloxacina 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 8: (gatifloxacina 1 $\mu\text{g/mL}$), 9: (cefepima 0,06 $\mu\text{g/mL}$), 10: (cefepima

2 µg/mL), 11: (ciprofloxacina 0,25 µg/mL), 12: (ciprofloxacina 2 µg/mL), 13: (ceftazidima 4 µg/mL), 14: (ceftazidima 32 µg/mL).

A expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa OmpW não foi detectada nem para a amostra selvagens 17066 e nem para os seus mutantes resistentes, como mostra a Figura 14.

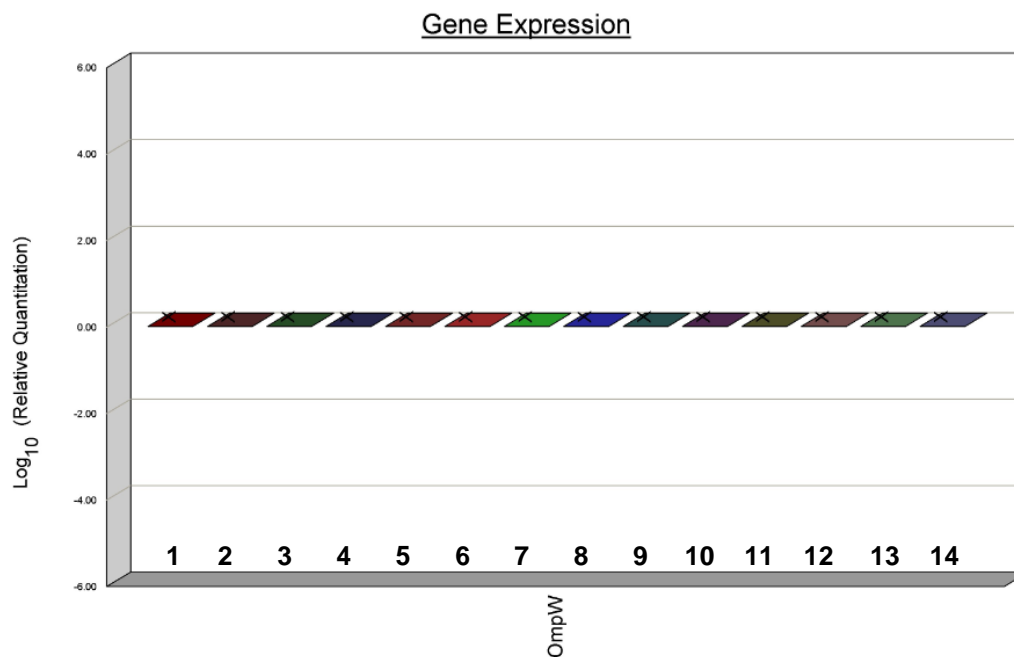


Figura 14. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa OmpW para amostra 17066 de *Acinetobacter* spp. Legenda: 1: amostra selvagem 17066. Amostra mutante selecionada com: 2: (meropenem 0,125 µg/mL), 3: (levofloxacina 0,25 µg/mL), 4: (levofloxacina 1 µg/mL), 5: (imipenem 0,06 µg/mL), 6: (imipenem 0,125 µg/mL), 7: (gatifloxacina 0,125µg/mL), 8: (gatifloxacina 1 µg/mL), 9: (cefepima 0,06 µg/mL), 10: (cefepima 2 µg/mL), 11: (ciprofloxacina 0,25 µg/mL), 12: (ciprofloxacina 2 µg/mL), 13: (ceftazidima 4 µg/mL), 14: (ceftazidima 32 µg/mL).

A terceira amostra analisada pela qRT-PCR foi a amostra 58054. Essa amostra apresentou resultados diferentes dos anteriores, como podemos

observar na Figura 15. Com excessão da amostra de polimixina B MIC= 0,25 $\mu\text{g/mL}$, nenhuma das outras amostras mutantes resistentes apresentaram expressão da β -lactamase do tipo AmpC quando comparadas com a amostra selvagem.

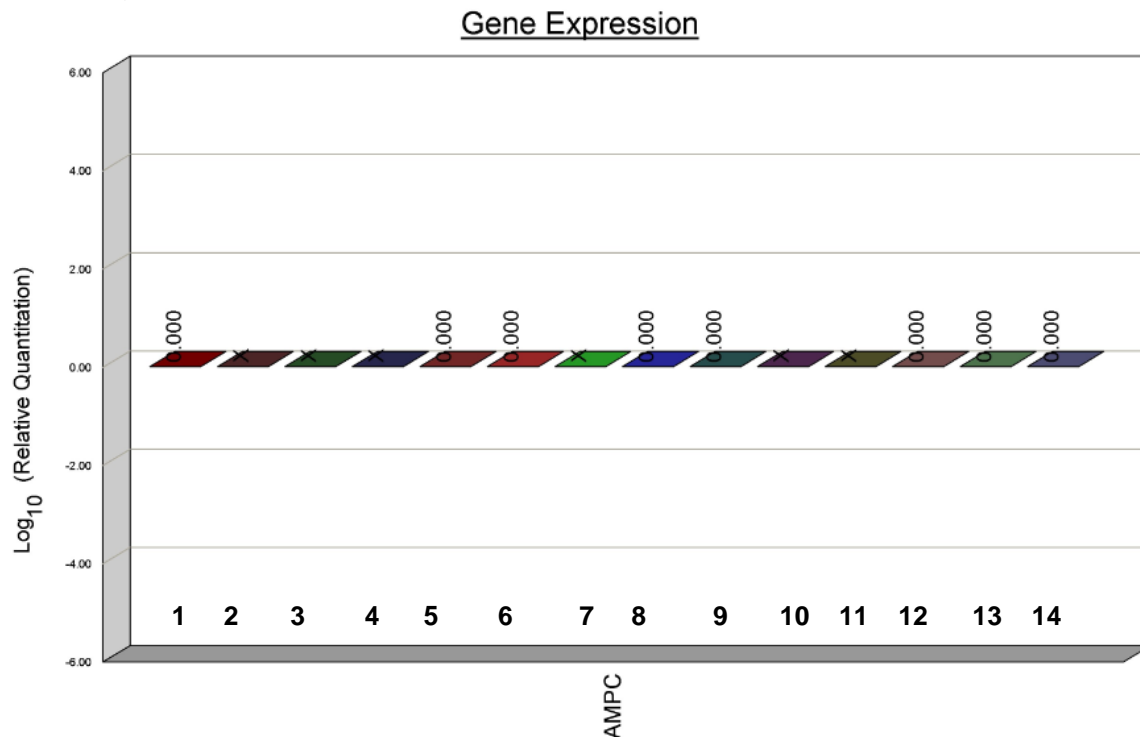


Figura 15. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica β -lactamase do tipo AmpC para amostra 58054 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 58054. Amostra mutante selecionada com: 2: (cefepima 0,5 $\mu\text{g/mL}$), 3: (cefepima 16 $\mu\text{g/mL}$), 4: (imipenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 5: (meropenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 6: (meropenem 2 $\mu\text{g/mL}$), 7: (ciprofloxacina 0,06 $\mu\text{g/mL}$), 8: (ciprofloxacina 4 $\mu\text{g/mL}$), 9: (gatifloxacina 0,06 $\mu\text{g/mL}$), 10: (gatifloxacina 0,5 $\mu\text{g/mL}$), 11: (levofloxacina 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 12: (levofloxacina 4 $\mu\text{g/mL}$), 13: (polimixina 0,25 $\mu\text{g/mL}$), 14: (polimixina 8 $\mu\text{g/mL}$).

A Figura 16 mostra os resultados encontrados na detecção da expressão da bomba de efluxo AdeB, assim como os resultados mostrado

anteriormente, nenhuma das amostra mutantes expressaram a bomba de efluxo AdeB, exceto a amostra mutante selecionada com 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de polimixina B.

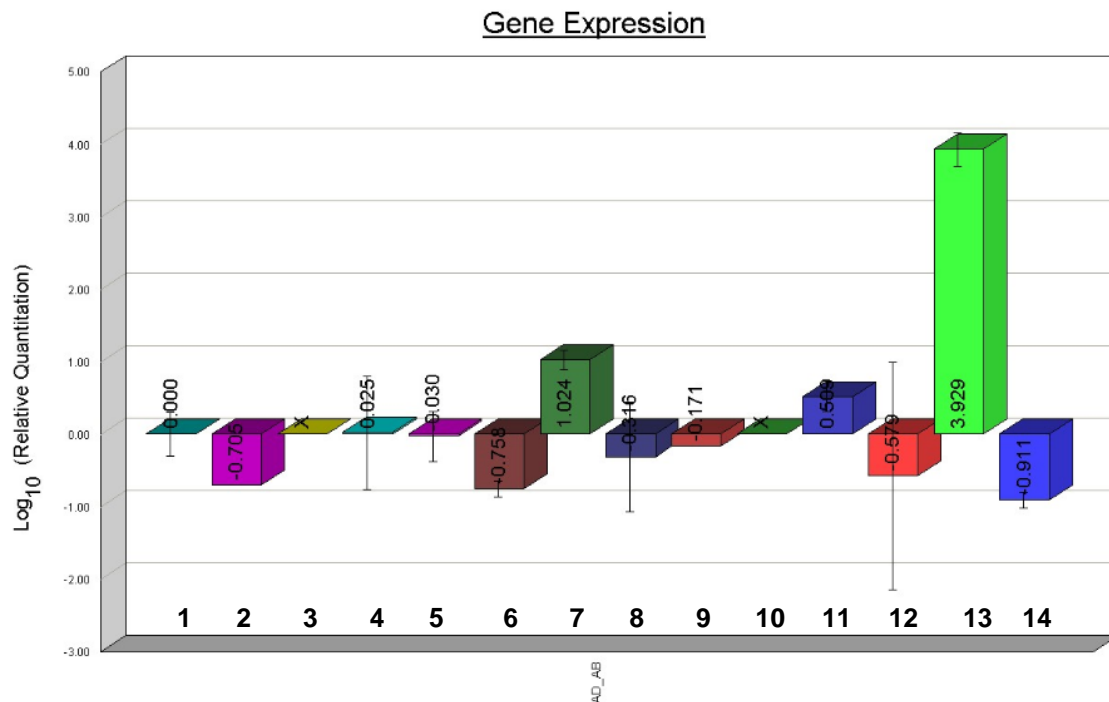


Figura 16. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica o sistema de bomba de efluxo AdeB para amostra 58054 de *Acinetobacter* spp. Legenda: 1: amostra selvagem 58054. Amostra mutante selecionada com: 2: (cefepima 0,5 $\mu\text{g/mL}$), 3: (cefepima 16 $\mu\text{g/mL}$), 4: (imipenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 5: (meropenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 6: (meropenem 2 $\mu\text{g/mL}$), 7: (ciprofloxacina 0,06 $\mu\text{g/mL}$), 8: (ciprofloxacina 4 $\mu\text{g/mL}$), 9: (gatifloxacina 0,06 $\mu\text{g/mL}$), 10: (gatifloxacina 0,5 $\mu\text{g/mL}$), 11: (levofloxacina 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 12: (levofloxacina 4 $\mu\text{g/mL}$), 13: (polimixina 0,25 $\mu\text{g/mL}$), 14: (polimixina 8 $\mu\text{g/mL}$).

Para a análise da proteína de membrana externa CarO quase todos os mutantes resistentes apresentaram uma diminuição na transcrição gênica dessa proteína de membrana externa, com exceção da amostra mutante selecionada com 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de polimixina B. A menor transcrição gênica de

CarO foi observado para a amostra mutante de gatifloxacina selecionada com 0,5 $\mu\text{g/mL}$, como mostra a Figura 17.

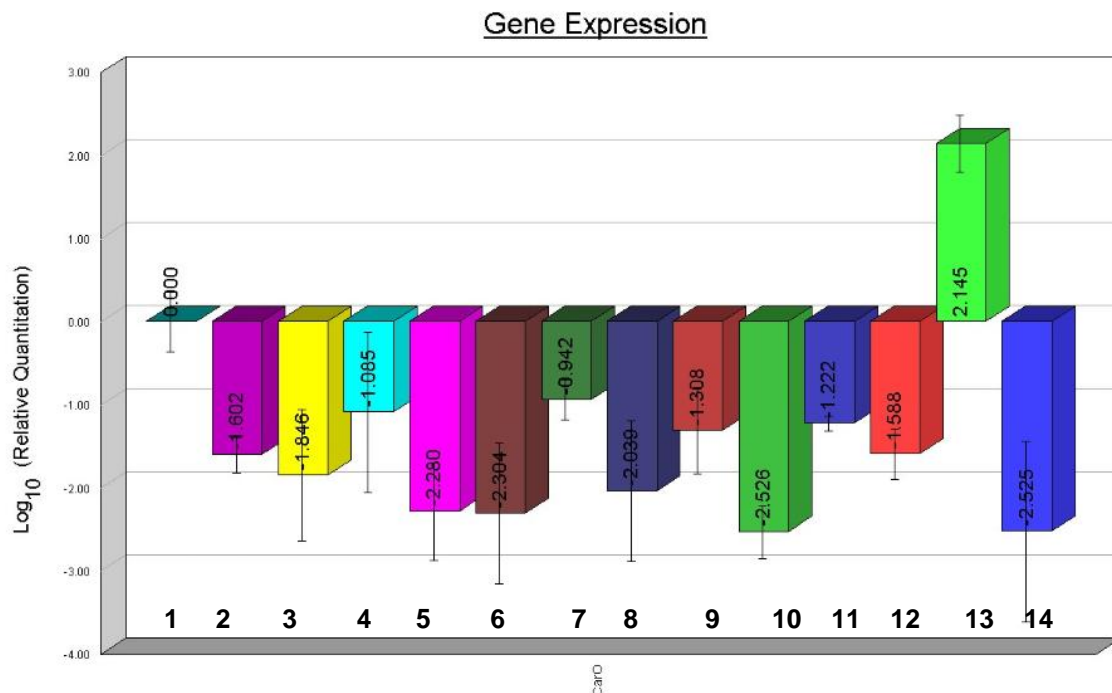


Figura 17. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa CarO para amostra 58054 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 58054. Amostra mutante selecionada com: 2: (cefepima 0,5 $\mu\text{g/mL}$), 3: (cefepima 16 $\mu\text{g/mL}$), 4: (imipenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 5: (meropenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 6: (meropenem 2 $\mu\text{g/mL}$), 7: (ciprofloxacina 0,06 $\mu\text{g/mL}$), 8: (ciprofloxacina 4 $\mu\text{g/mL}$), 9: (gatifloxacina 0,06 $\mu\text{g/mL}$), 10: (gatifloxacina 0,5 $\mu\text{g/mL}$), 11: (levofloxacina 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 12: (levofloxacina 4 $\mu\text{g/mL}$), 13: (polimixina 0,25 $\mu\text{g/mL}$), 14: (polimixina 8 $\mu\text{g/mL}$).

A transcrição gênica para proteína de membrana externa OmpA, como mostra a Figura 18, também apresentou diminuição na sua expressão para a maioria dos mutantes resistentes, com exceção aos mutantes selecionados com 0,125 $\mu\text{g/mL}$ de meropenem e 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de polimixina B.

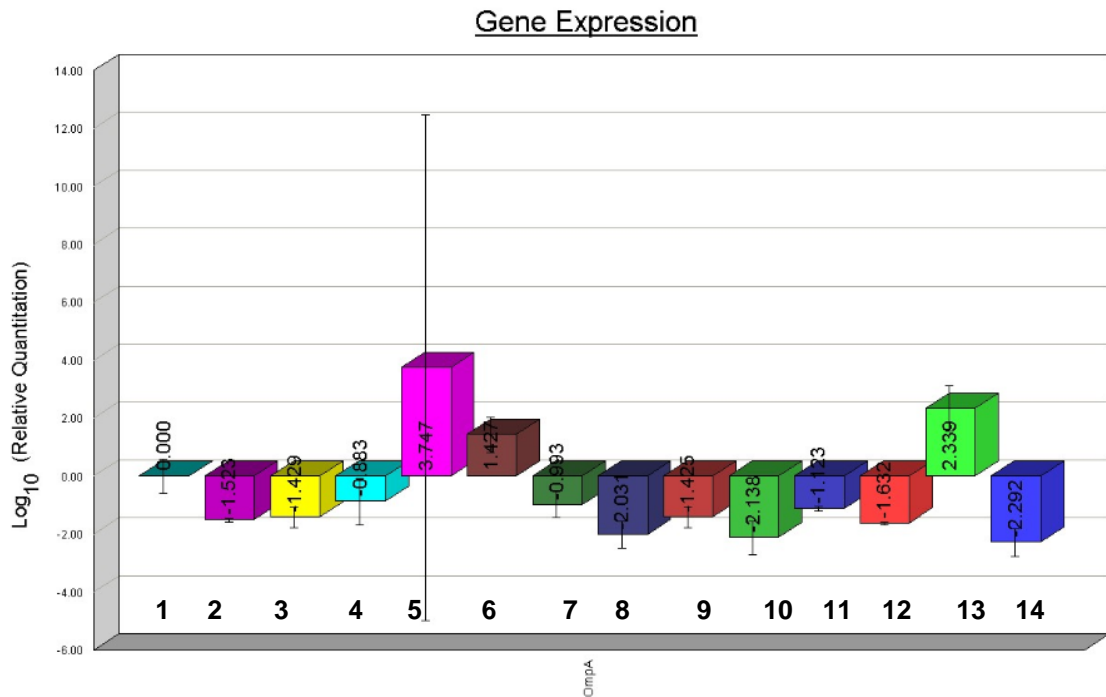


Figura 18. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa OmpA para amostra 58054 de *Acinetobacter* spp. Legenda: 1: amostra selvagem 58054. Amostra mutante selecionada com: 2: (cefepima 0,5 µg/mL), 3: (cefepima 16 µg/mL), 4: (imipenem 0,125 µg/mL), 5: (meropenem 0,125 µg/mL), 6: (meropenem 2 µg/mL), 7: (ciprofloxacina 0,06 µg/mL), 8: (ciprofloxacina 4 µg/mL), 9: (gatifloxacina 0,06 µg/mL), 10: (gatifloxacina 0,5 µg/mL), 11: (levofloxacina 0,125 µg/mL), 12: (levofloxacina 4 µg/mL), 13: (polimixina 0,25 µg/mL), 14: (polimixina 8 µg/mL).

Já para a avaliação da expressão da proteína de membrana externa OmpW, o único mutante resistente que apresentou diminuição na expressão dessa proteína foi o mutante de meropenem 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como pode ser observado na Figura 19, para todos os outros mutantes resistentes não foi possível detectar a expressão da proteína de membrana externa OmpW.

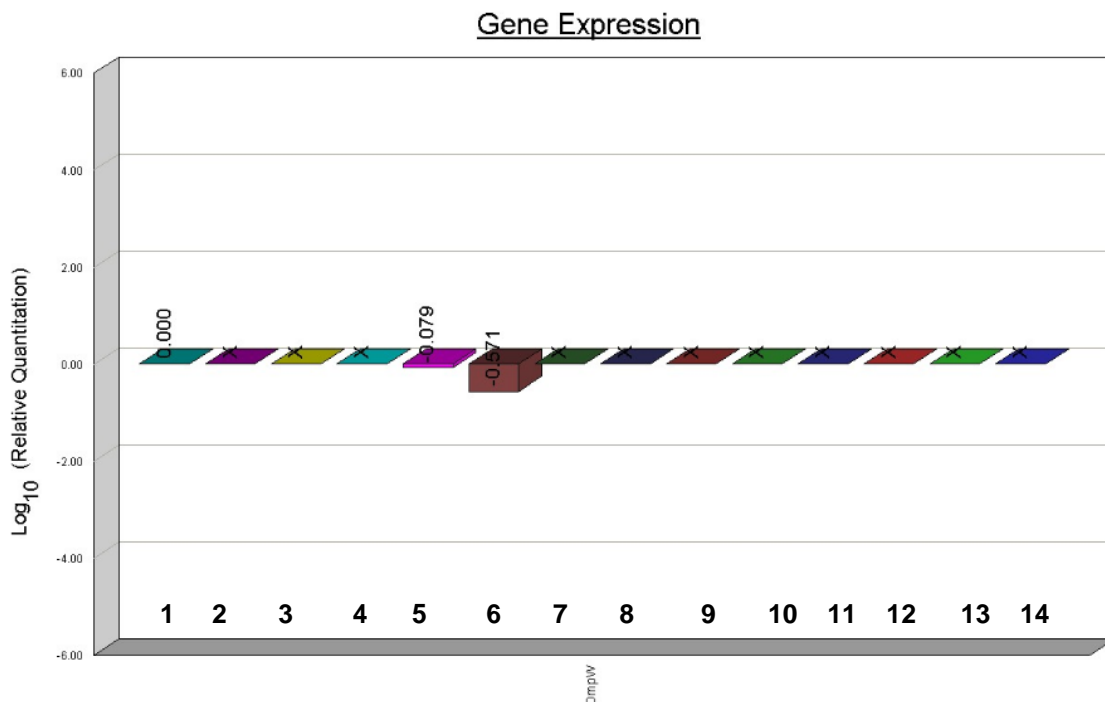


Figura 19. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa OmpW para amostra 58054 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 58054,

Amostra mutante selecionada com: 2: (cefepima 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 3: (cefepima 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4: (imipenem 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5: (meropenem 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 6: (meropenem 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 7: (ciprofloxacina 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 8: (ciprofloxacina 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 9: (gatifloxacina 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 10: (gatifloxacina 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 11: (levofloxacina 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 12: (levofloxacina 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 13: (polimixina 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 14: (polimixina 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

A quarta amostra analisada pela qRT-PCR foi a amostra de *Acinetobacter* spp. 80083.

Quanto a produção de β -lactamase do tipo AmpC os mutante de ceftazidima, imipenem, levofloxacina e polimixina B foram os que apresentaram aumento na expressão da produção dessa β -lactamase, sendo o mutante de polimixina B MPC= 16 $\mu\text{g/mL}$ o mutante que mais expressou AmpC quando comparado com a amostra selvagem (1,297 vezes mais), como pode ser visualizado na Figura 20.

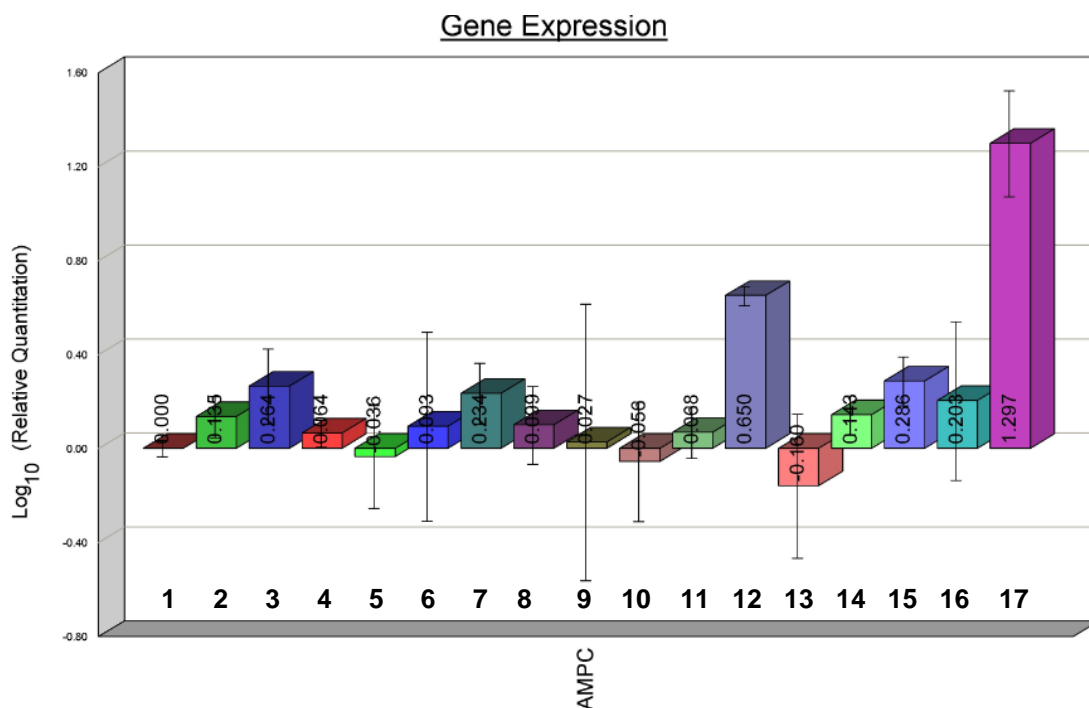


Figura 20. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica β -lactamase do tipo AmpC para amostra 146098 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 146098. Amostra mutante selecionada com: 2: (ceftazidima 4 $\mu\text{g/mL}$), 3: (ceftazidima 32 $\mu\text{g/mL}$), 4: (cefepima 4 $\mu\text{g/mL}$), 5: (cefepima 32 $\mu\text{g/mL}$), 6: (imipenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 7: (imipenem 2 $\mu\text{g/mL}$), 8: (meropenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 9: (meropenem 4 $\mu\text{g/mL}$), 10: (ciprofloxacina 0,03 $\mu\text{g/mL}$), 11: (ciprofloxacina 2 $\mu\text{g/mL}$), 12 (gatifloxacina 0,06 $\mu\text{g/mL}$), 13:

(gatifloxacina 1 $\mu\text{g/mL}$), 14: (levofloxacina 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 15: (levofloxacina 2 $\mu\text{g/mL}$), 16: (polimixina 0,25 $\mu\text{g/mL}$), 17: (polimixina 16 $\mu\text{g/mL}$).

A expressão do gene que codifica o sistema de bomba de efluxo *adeB*, entre as amostras 146098 foi detectada apenas para amostra mutante de gatifloxacina 0,06 $\mu\text{g/mL}$, como mostra a Figura 21.

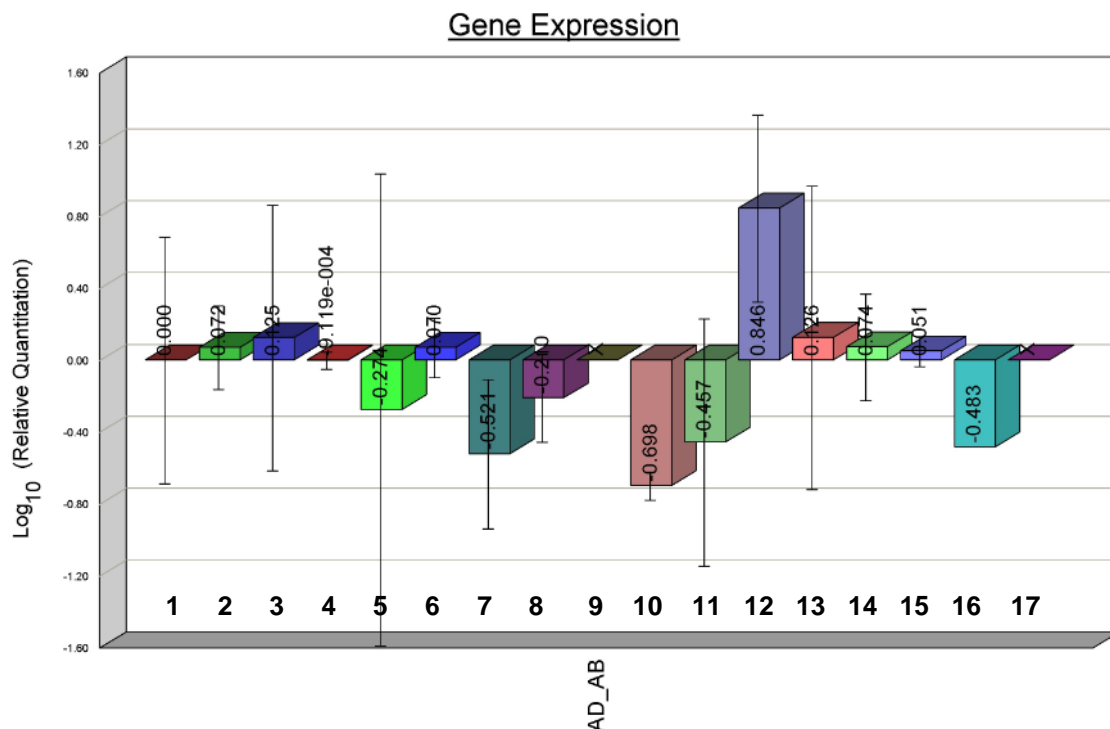


Figura 21. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica o sistema de bomba de efluxo AdeB para amostra 146098 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 146098. Amostra mutante selecionada com: 2: (ceftazidima 4 $\mu\text{g/mL}$), 3: (ceftazidima 32 $\mu\text{g/mL}$), 4: (cefepima 4 $\mu\text{g/mL}$), 5: (cefepima 32 $\mu\text{g/mL}$), 6: (imipenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 7: (imipenem 2 $\mu\text{g/mL}$), 8: (meropenem 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 9: (meropenem 4 $\mu\text{g/mL}$), 10: (ciprofloxacina 0,03 $\mu\text{g/mL}$), 11: (ciprofloxacina 2 $\mu\text{g/mL}$), 12 (gatifloxacina 0,06 $\mu\text{g/mL}$), 13: (gatifloxacina 1 $\mu\text{g/mL}$), 14: (levofloxacina 0,125 $\mu\text{g/mL}$), 15: (levofloxacina 2 $\mu\text{g/mL}$), 16: (polimixina 0,25 $\mu\text{g/mL}$), 17: (polimixina 16 $\mu\text{g/mL}$).

Para análise da expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa CarO, os mutantes de ciprofloxacina e gatifloxacina foram os que apresentaram a maior diminuição na expressão dessa proteína, como mostra a Figura 22.

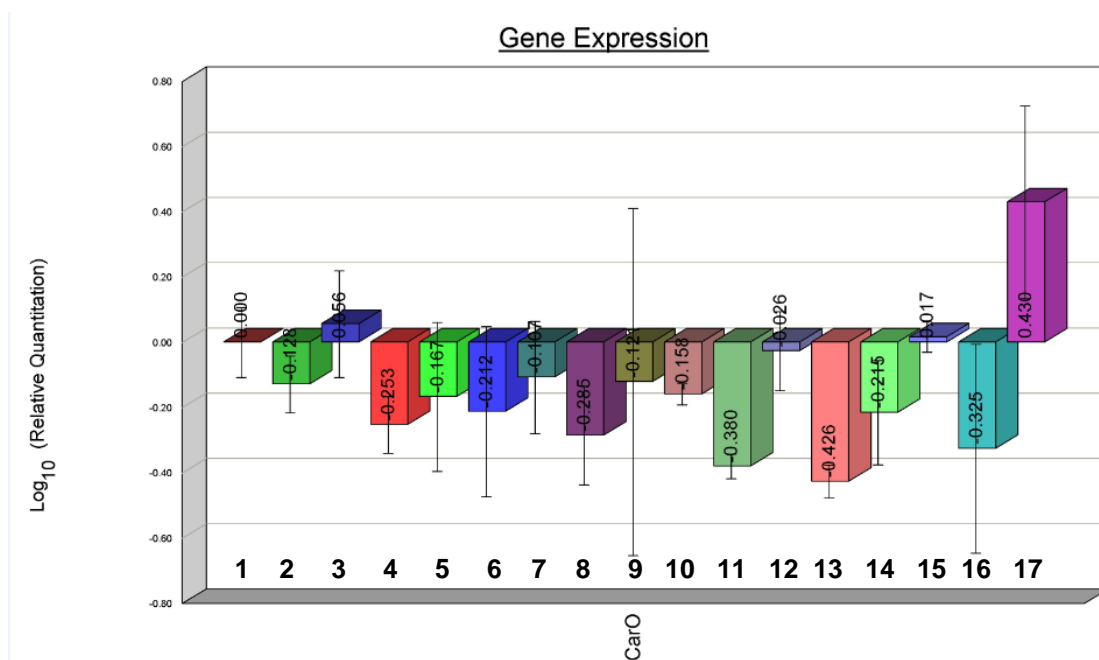


Figura 22. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa CarO para amostra 146098 de *Acinetobacter* spp. Legenda: 1: amostra selvagem 146098. Amostra mutante selecionada com: 2: (ceftazidima 4 µg/mL), 3: (ceftazidima 32 µg/mL), 4: (cefepima 4 µg/mL), 5: (cefepima 32 µg/mL), 6: (imipenem 0,125 µg/mL), 7: (imipenem 2 µg/mL), 8: (meropenem 0,125 µg/mL), 9: (meropenem 4 µg/mL), 10: (ciprofloxacina 0,03 µg/mL), 11: (ciprofloxacina 2 µg/mL), 12 (gatifloxacina 0,06 µg/mL), 13: (gatifloxacina 1 µg/mL), 14: (levofloxacina 0,125 µg/mL), 15: (levofloxacina 2 µg/mL), 16: (polimixina 0,25 µg/mL), 17: (polimixina 16 µg/mL).

A figura 23 mostra a análise da proteína de membrana externa OmpA, como podemos visualizar os mutantes de ceftazidima, ciprofloxacina, levofloxacina e gatifloxacina foram os que apresentaram diminuição da expressão dessa proteína de maneira gradativa.

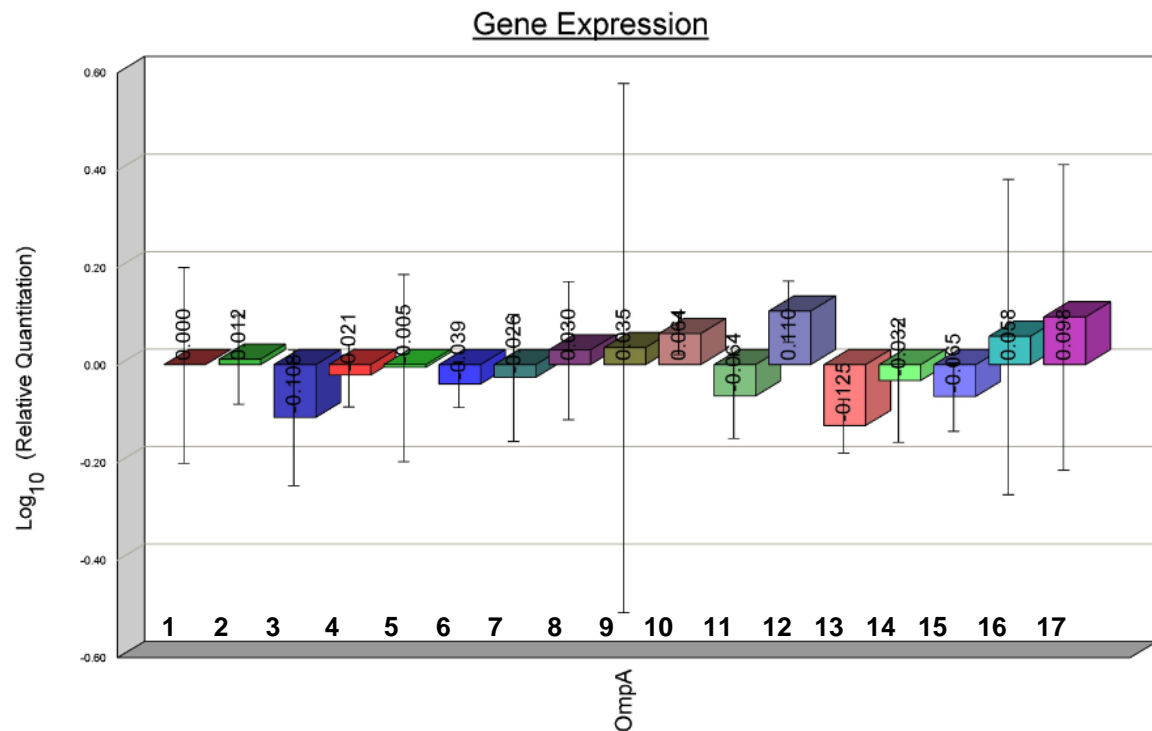


Figura 23. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa OmpA para amostra 146098 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 146098. Amostra mutante selecionada com: 2: (ceftazidima 4 µg/mL), 3: (ceftazidima 32 µg/mL), 4: (cefepima 4 µg/mL), 5: (cefepima 32 µg/mL), 6: (imipenem 0,125 µg/mL), 7: (imipenem 2 µg/mL), 8: (meropenem 0,125 µg/mL), 9: (meropenem 4 µg/mL), 10: (ciprofloxacina 0,03 µg/mL), 11: (ciprofloxacina 2 µg/mL), 12 (gatifloxacina 0,06 µg/mL), 13: (gatifloxacina 1 µg/mL), 14: (levofloxacina 0,125 µg/mL), 15: (levofloxacina 2 µg/mL), 16: (polimixina 0,25 µg/mL), 17: (polimixina 16 µg/mL).

Como pode ser observado na Figura 24, não foi possível detectar a expressão da proteína de membrana externa OmpW para nenhuma amostra de *Acinetobacter* spp. 146098 nem mesmo para a amostra selvagem.

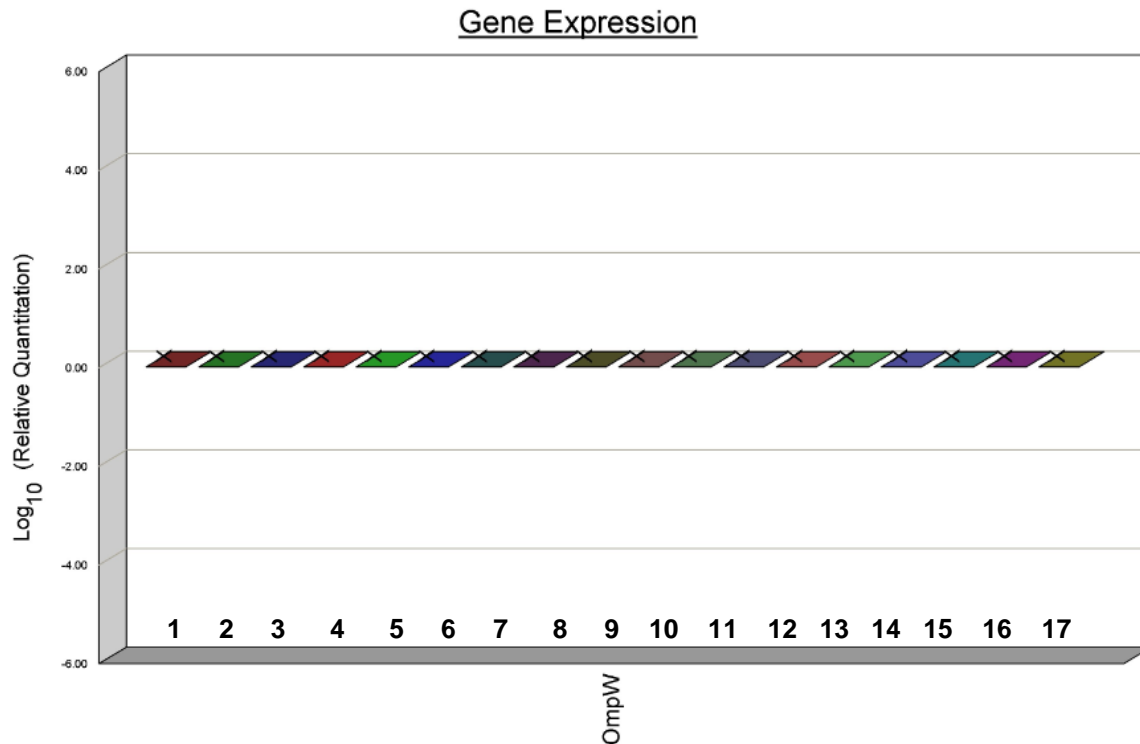


Figura 24. Quantificação relativa da expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa OmpW para amostra 146098 de *Acinetobacter* spp.

Legenda: 1: amostra selvagem 30083. Amostra mutante selecionada com: 2: (ceftazidima 4 µg/mL), 3: (ceftazidima 32 µg/mL), 4: (cefepima 4 µg/mL), 5: (cefepima 32 µg/mL), 6: (imipenem 0,125 µg/mL), 7: (imipenem 2 µg/mL), 8: (meropenem 0,125 µg/mL), 9: (meropenem 4 µg/mL), 10: (ciprofloxacina 0,03 µg/mL), 11: (ciprofloxacina 2 µg/mL), 12 (gatifloxacina 0,06 µg/mL), 13: (gatifloxacina 1 µg/mL), 14: (levofloxacina 0,125 µg/mL), 15: (levofloxacina 2 µg/mL), 16: (polimixina 0,25 µg/mL), 17: (polimixina 16 µg/mL).

5. Discussão

Acinetobacter spp. é um cocobacilo não fermentador, que há três décadas passadas surgiu como um organismo de patogenicidade questionável e que se tornou um importante agente infeccioso em várias regiões do mundo (Fournie & Richer, 2006; Dima *et al.*, 2007).

Infecções causadas por *Acinetobacter* spp. tem sido relatadas com maior freqüência em países tropicais (Munhoz-Prince, 2008). Na América Latina, particularmente, no Brasil, *Acinetobacter* spp. encontra-se entre os agentes etiológicos mais freqüentes responsáveis por infecções hospitalares, especialmente em pacientes com infecções do trato respiratório associada à ventilação mecânica (Sader *et al.*, 2001; Tognim, *et al.*, 2004).

Diversos estudos multicêntricos, envolvendo hospitais brasileiros têm demonstrado que a maioria dos isolados de *Acinetobacter* spp. são sensíveis somente aos carbapenens (imipenem e/ou meropenem) e às polimixinas, e, cerca de 10 a 20% são resistentes a quase todos os antimicrobianos disponíveis comercialmente, com exceção das polimixinas (Gales *et al.*, 1996; Sader *et al.*, 1998b; Tognim, *et al.*, 2004).

Foram selecionados para este estudo 20 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. sensíveis aos β -lactâmicos, fluoroquinolonas e polimixina B, provenientes de infecção de corrente sanguínea de pacientes internados no Hospital São Paulo. Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. foram realizados pela técnica de disco difusão e, posteriormente, os seus resultados confirmados pela técnica de ágar diluição.

Como o conceito da MPC é uma estratégia a ser utilizada na prevenção do crescimento de bactérias mutantes resistentes, foram selecionadas somente amostras sensíveis aos respectivos antimicrobianos para este estudo.

Os antimicrobianos avaliados no presente estudo demonstraram alta atividade *in vitro* contra todos os isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. Entre os antimicrobianos testados, interessantemente, a gatifloxacina foi o agente antimicrobiano mais potente contra os isolados clínicos de *Acinetobacter* spp., apresentando-se duas vezes mais potente que os carbapenems. Esse resultado contrasta com os resultados obtidos por Sader e colaboradores em um estudo multicêntrico realizado em 2001, onde foram avaliados os principais microrganismos isolados em infecções de corrente sanguínea, e os carbapenems foram os antimicrobianos que apresentaram maior atividade contra *Acinetobacter* spp. (Sader *et al.* 2001).

O Food and Drug Administration (FDA), junto com a empresa Bristol Myers Squibb, publicaram no dia 16 de fevereiro de 2006, um alerta aos profissionais da saúde sobre mudanças na seção de contra-indicações quanto à prescrição do produto gatifloxacina (Tequim[®]) devido ao risco de sérias alterações nos níveis de glicose, e contra-indicando o uso deste agente para pacientes diabéticos. Após a divulgação deste comunicado a gatifloxacina foi retirada do mercado, uma vez que os efeitos colaterais são graves e alguns desses casos foram fatais. (http://www.anvisa.gov.br/farmacovigilancia/informes/2006/informe_1.htm).

Atualmente, para a determinação da MIC, um inóculo padronizado contendo $10^4 - 10^5$ UFC/mL é utilizado. Este inóculo pode não conter as subpopulações mutantes resistentes presentes em um processo infeccioso.

Essas mutações espontâneas ocorrem em uma frequência baixa (10^{-6} ou 10^{-8} UFC). Por isso, quando se avalia a MPC, um inóculo suficientemente maior deve ser utilizado para que haja oportunidade de avaliar qual a concentração de antimicrobiano é capaz de prevenir o crescimento destas bactérias.

A MPC é definida como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de bactérias mutantes resistentes quando uma concentração bacteriana $\geq 10^9$ UFC/mL é semeada em placas de ágar contendo diferentes concentrações de antimicrobianos. Em resumo, a MPC pode ser definida como a MIC das subpopulações bacterianas resistentes que ocorrem naturalmente (Blondeau *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 1999; Drlica, 2001; Zhao & Drlica, 2001).

Um fator importante que pode variar na recuperação de subpopulação de mutante é o período de incubação dessas amostras durante os experimentos. Um estudo comparando a determinação da MPC, em 24 horas *versus* 48 horas de incubação, mostrou que a frequência de seleção de mutantes resistentes foi mais alta no período de 48 horas (Randall *et al.*, 2004). Entretanto, em um outro estudo que avaliou comparativamente a MPC obtida em 48 horas, com aquela obtida após 7 dias de incubação, demonstrou que não havia maior recuperação de mutantes resistentes após 48 horas (Linde & Lehn, 2004). Por isso, foi optado neste estudo, para que a MPC fosse determinada após 48 horas de incubação, a 37°C.

Diversos estudos relatam que, em infecções bacterianas, a concentração do microrganismo no sítio infeccioso pode ser $\geq 10^{10}$ células (Bingen *et al.*, 1990; Low, 2001). Conseqüentemente, por se tratar de um inóculo relativamente alto, foi difícil a padronização dos testes para que esta contagem da população

bacteriana fosse atingida. Para garantir que esse inóculo tivesse sido alcançado *in vitro* a contagem de colônias foi realizada durante todos os experimentos. Ainda, para garantir que havia ocorrido realmente a seleção de cepas mutantes, após o término dos experimentos realizados para determinação da MPC, foi realizada a detecção da MIC pela técnica de E-test[®] para algumas amostras bacterianas selecionadas nas placas de MPC.

No presente estudo, foi avaliada a MPC para os seguintes agentes antimicrobianos: β -lactâmicos (ceftazidima, cefepima, imipenem e meropenem), fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina e gatifloxacina) e polimixinas (polimixina B). Smith e colaboradores (2003) publicaram um trabalho criticando a aplicabilidade do conceito da MPC para prevenção da resistência a outras classes antimicrobianas, que não fosse a das fluoroquinolonas. Segundo esse trabalho, o conceito da MPC não poderia ser extrapolado para outros agentes antimicrobianos, cujos mecanismos de resistência bacteriana não fossem decorrentes de mutações cromossômicas. Entretanto, esses autores basearam-se em um número extremamente limitado de publicações, cuja qualidade dos resultados foi questionada pelos próprios autores, já que alguns destes trabalhos utilizaram amostras já resistentes e não avaliaram o mecanismo de resistência presente nas amostras mutantes (Smith, 2003).

Em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. a resistência às cefalosporinas de amplo espectro e carbapenens pode ser conseqüente à produção de β -lactamases, que pode ser mediada por genes plasmidiais ou cromossomais. Porém, entre as amostras de *Acinetobacter* spp., a hiperprodução de β -lactamases do tipo AmpC, mediada por genes cromossômicos, associada à alteração de proteínas de membrana externa, tem sido um importante mecanismo

de resistência aos β -lactâmicos descrito até o momento (Livermore, 1995; 2002; 2003). Portanto, nesse caso seria aceitável a avaliação do conceito da MPC para essa classe de antimicrobianos.

Com o aumento da prevalência de amostras de *Acinetobacter* spp. multirresistentes, o uso parenteral das polimixinas foi restabelecido, apesar da toxicidade e das características farmacocinéticas desfavoráveis (Levin *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 1999). Levin e colaboradores em um estudo realizado em 1999 relataram o uso intravenoso da polimixina E para o tratamento de infecções causadas por amostras multirresistentes de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Segundo esse trabalho, 35 (58,0%) dos 60 pacientes tratados apresentaram boa resposta clínica. No entanto, a falha terapêutica foi relatada em 75% dos pacientes que receberam polimixina E para o tratamento de pneumonias. No presente estudo, quase todas as amostras selecionadas eram sensíveis a polimixina B, com exceção apenas de uma única amostra que apresentou MIC igual a 4 $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2006). Por se tratar de um antimicrobiano de suma importância no tratamento de bactérias multirresistentes e pelo seu mecanismo de resistência ainda não ser totalmente esclarecido, acreditamos que seria interessante a avaliação da MPC das amostras de *Acinetobacter* spp. frente a este agente antimicrobiano.

Um estudo conduzido por Drlica e colaboradores (2006), demonstrou uma baixa correlação para várias quinolonas contra amostras de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Assim como diversos outros estudos também têm observado e relatado uma baixa correlação entre a MIC e a MPC (Marcusson *et al.*, 2005; Randall *et al.*, 2004; Sindelar *et al.*, 2000; Zhao & Drlica, 2002, Gugel, 2006). Do

mesmo modo, no presente estudo, encontramos uma baixa correlação entre a MIC e a MPC para todos os antimicrobianos testados contra *Acinetobacter* spp. Embora o valor da correlação da ciprofloxacina ($r^2= 0,15$) e da levofloxacina ($r^2= 0,20$) seja um pouco diferente do valor encontrado por Drlica, ambos os estudos confirmam a baixa correlação entre a MIC e a MPC para os diferentes antimicrobianos e espécies bacterianas testadas, enfatizando a importância da determinação da MPC, caso haja interesse em empregar este conceito na seleção do regime terapêutico mais adequado.

Em 1997, Baquero e Negri sugeriram que o favorecimento do crescimento de mutantes resistentes ocorre em uma área denominada de “janela para seleção de mutantes” (“*Mutant Selection Window*”- MSW). A MSW é a concentração de antimicrobiano que se situa entre a MIC e a MPC. Portanto, para evitar o surgimento de bactérias mutantes resistentes, o nível sérico e/ou tecidual de antimicrobiano deveria permanecer acima da MPC.

Combinações de duas ou mais drogas poderiam ser utilizadas para reduzir a janela para seleção de mutantes, caso um antimicrobiano possua uma elevada MPC que não possa ser atingida com as doses habituais empregadas nos esquemas terapêuticos e que doses mais elevadas não podem ser utilizadas devido à toxicidade (Lu *et al.*, 2003; Zhao & Drlica, 2001). Um exemplo dessa situação é aquela encontrada na utilização da rifampicina para o tratamento da infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis*. A concentração sérica da rifampicina é inferior à sua MPC e doses mais elevadas não podem ser empregadas clinicamente por causarem hepatotoxicidade. Com isso, a monoterapia com rifampicina é rapidamente seguida pelo surgimento de mutantes resistentes. Conseqüentemente, rifampicina deve ser utilizada em

regimes combinados com outros agentes anti-tuberculostáticos (Dong *et al.*, 2000).

É interessante que o regime terapêutico combinado empregue agentes antimicrobianos que possuam diferentes alvos de ação e, dessa maneira, mutações distintas seriam necessárias para a aquisição de resistência (Drlica, 2003). Além disso, é necessário que as drogas associadas apresentem perfis farmacocinéticos semelhantes para que não ocorra a seleção de subpopulações mutantes resistentes. Uma vez que, se os antimicrobianos apresentam diferentes perfis farmacocinéticos, estes poderiam atuar como monoterapia na janela para seleção de mutantes favorecendo, assim, a seleção de mutantes resistentes (Zhao & Drlica, 2001).

Para determinar qual antimicrobiano menos selecionaria e favoreceria o crescimento de mutantes resistentes, analisamos, no presente estudo, a relação MPC/MIC. Quanto menor essa razão, menor seria a janela para a seleção de mutantes, ou seja, menor a chance de selecionar subpopulações mutantes resistentes (Drlica, 2003; Zhao & Drlica, 2001). No presente estudo, a razão MPC/MIC para as fluoroquinolonas demonstrou que a levofloxacina (32) foi o antimicrobiano que apresentou menor janela para seleção de mutantes, seguida por gatifloxacina (64) e ciprofloxacina (128). Em contraste, em um estudo realizado por Hansen (2005), a levofloxacina apresentou uma janela para seleção de mutante duas vezes maior que a da ciprofloxacina, ou seja, ciprofloxacina foi a fluoroquinolona mais ativa para inibir a seleção e o crescimento de subpopulações de mutantes resistentes.

Baseando-se nas concentrações séricas atingidas pelos antimicrobianos testados neste estudo, quando doses habituais são utilizadas, somente os carbapenens e a levofloxacina foram capazes de atingir concentrações séricas suficientes para suprimir o favorecimento do crescimento de amostras mutantes resistentes e poderiam ser, assim, utilizados como monoterapia no tratamento das infecções causadas por *Acinetobacter* spp.

Entre todas as classes de antimicrobianos avaliados, a polimixina B foi o antimicrobiano que apresentou a menor relação MPC/MIC (16), entretanto, a concentração sérica máxima atingida quando doses habituais foram prescritas, seria inferior àquela da MPC. Por se tratar de uma droga que pode apresentar nefrotoxicidade e neurotoxicidade, não seria recomendada a elevação das doses para que concentrações iguais ou superiores a MPC fossem atingidas, evitando dessa maneira, o surgimento de subpopulações mutantes, quando as polimixinas fossem utilizadas como monoterapia. Uma das razões que poderia justificar a alta MPC para polimixina B no presente estudo seria o mecanismo adaptativo, onde a bactéria se adaptaria às concentrações de polimixina contidas no meio de cultura, portanto as amostras que cresceram nas placas para avaliação da MPC poderiam ter sido selecionadas pela presença da polimixina no meio e não porque tivessem sofrido mutações. Ainda, uma outra possibilidade seria a não aplicabilidade do conceito da MPC à combinação *Acinetobacter* spp. versus polimixina B, uma vez que o surgimento de amostras de *Acinetobacter* spp. resistentes às polimixinas não tem sido freqüentemente observado na prática clínica. Em contraste, os antimicrobianos que apresentaram a maior janela para seleção de mutantes no presente estudo foram os β -lactâmicos ceftazidima e cefepima (> 32) e os carbapenens, imipenem e meropenem (64).

Para melhor elucidar qual mecanismo de resistência as bactérias utilizaram para driblar a ação dos antimicrobianos, resolvemos avaliar os principais mecanismos de resistência descrito em *Acinetobacter* spp. como a provável hiperprodução de β -lactamase do tipo AmpC, detecção de mutação nas regiões determinantes de resistência as quinolonas (QRDR) dos genes *gyrA* e *parC* e alteração da permeabilidade de membrana externa.

Inicialmente, o mecanismo de resistência de todas as amostras mutantes resistentes, isoladas na janela para seleção de mutantes, ou seja, acima da MIC e abaixo da MPC seriam avaliadas. Porém, como o número de amostras mutantes situadas nesta faixa foi muito grande optamos por avaliar os mecanismos de resistência somente em cinco amostras de cada combinação espécie *versus* antimicrobiano. Essas amostras foram selecionadas, preferencialmente, baseadas nos diferentes intervalos da MIC e da MPC.

Para cada antimicrobiano, foi detectado o mecanismo de resistência em uma amostra isolada na concentração correspondente à MIC, uma amostra isolada no intervalo entre a MIC e a MPC, e outra isolada na concentração referente à MPC, quando possível.

Primeiramente, foi avaliada, no presente estudo, a hiperprodução de β -lactamase do tipo AmpC, onde foi feita a comparação entre a taxa de hidrólise da ceftazidima, pela bactéria selvagem *versus* bactéria mutante. Além da ceftazidima, foram utilizados também cefepima e imipenem como substratos. Interessantemente, não foi detectada nenhuma hidrólise durante os experimentos para nenhum dos antimicrobianos β -lactâmicos avaliados. Recentemente, foi identificada em *A. baumannii* uma *Insertion Sequence* (IS) denominada IS_{ABA-1}.

Essa IS_{ABA-1} está presente no cromossomo de *Acinetobacter* spp. Esse elemento móvel pode apresentar um importante papel na regulação da expressão de vários genes de resistência em *Acinetobacter* spp.. Portanto, a regulação de genes de resistência que codificam as β -lactamases, *ampC*, *bla*_{oxa-23} e *bla*_{oxa-27} também são influenciadas pela presença de IS_{ABA-1} (Segal *et al.*, 2007). A presença deste elemento de inserção na região promotora destes genes resultaria, respectivamente, no aumento da expressão destes, ocasionando o aumento da produção das respectivas β -lactamases.

Para a determinação da mutação nas QRDR dos genes *gyrA* e *parC*, foi realizado a PCR e, posteriormente, o sequenciamento dessas regiões para detecção das possíveis mutações ocorridas. Entretanto, os resultados deste estudo mostram que não foi detectada nenhuma mutação nas amostras avaliadas. Dessa maneira, os resultados encontrados neste estudo, são discordantes de diversos estudos anteriores que avaliaram e determinaram mutações nas QRDR dos genes *gyrA* e *parC* em amostras mutantes selecionadas a partir da metodologia aplicada para avaliação da MPC (Hansen, 2005; Randall *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2007). Sabendo que o primer utilizado nos experimentos avaliaram a região correta para determinação de resistência às quinolonas, outro mecanismo que poderia estar presente entre as amostras mutantes resistentes às quinolonas seria a hiperexpressão de sistemas de bomba de efluxo. O principal sistema de efluxo descrito em *Acinetobacter* spp. é o sistema AdeABC, por isso optamos avaliar apenas esse, entretanto o sistema de efluxo AbeM, pertencente a família MATE, também pode estar envolvido na resistência às fluoroquinolonas.

A análise da permeabilidade de membrana externa foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, a fim de se observar se havia ocorrido alteração nas proteínas de membrana externa que pudesse justificar a seleção de amostras mutantes. Entretanto, mais uma vez, não foi observada nenhuma alteração nas proteínas de membrana externa das amostras mutantes estudadas em relação às cepas selvagens.

Como não foi detectada nenhuma alteração nas amostras mutantes, quando comparadas às amostras selvagens, surgiu o questionamento de que, se durante o armazenamento dessas amostras, a bactéria poderia ter perdido a capacidade de expressar seu mecanismo de resistência, devido ao fato de ter sido armazenada em freezer -70 °C ou por qualquer outro fator ambiental, apesar destas amostras terem sido armazenadas em concentrações subinibitórias de antimicrobianos. Portanto, na tentativa de avaliar a possível influência do congelamento foram selecionadas aleatoriamente três amostras entre as amostras avaliadas anteriormente, e todos os experimentos foram realizados sequencialmente. Após a recuperação das amostras armazenadas no freezer -70°C, com dois repiques consecutivos em ágar sangue, essas foram submetidas novamente à determinação da MPC e, em seguida, à avaliação da taxa de hidrólise, PCR e análise das proteínas de membrana externa. Novamente, não foi detectado nenhum tipo de alteração nas amostras mutantes quando comparada às amostras selvagens, respectivamente. Portanto, de acordo com os resultados obtidos podemos sugerir que não houve influência do congelamento na avaliação dos possíveis mecanismos de resistência obtidos.

Devido aos resultados apresentados, optamos por avaliar hiperexpressão de β -lactamase do tipo AmpC, efluxo e alteração de permeabilidade de

membrana externa em *Acinetobacter* spp., pela técnica da PCR em tempo real (qRT-PCR), nas amostras mutantes: Para a análise por qRT-PCR, foram avaliadas quatro amostras selvagens para cada antimicrobiano, além das suas respectivas amostras mutantes, uma recuperada nas concentrações correspondentes no valor da MIC e outra no valor da MPC.

Para selecionar os genes de resistência que deveríamos analisar, primeiramente verificou-se que o aparecimento de *Acinetobacter* spp. multirresistente tem se tornado cada vez mais freqüente, e as opções terapêuticas no tratamento das infecções causadas por esses microrganismos tem se tornado cada vez mais limitada. Um fator muito importante nos isolados de *Acinetobacter* spp. é a resistência intrínseca que esse microrganismo possui, que pode ser explicada devido a baixa permeabilidade de membrana externa, produção de β -lactamase do tipo AmpC (cromossomal) e ainda, a expressão de alguns sistemas de bomba de efluxo constitutiva.

Durante a avaliação da qRT-PCR para o gene AmpC, pode-se verificar em nossos resultados que houve um aumento de aproximadamente quatro vezes e sete vezes na transcrição deste gene nas amostras selecionadas com imipenem e meropenem, respectivamente, para as amostras mutantes quando comparadas à amostra selvagem (30078). Porém, quando avaliadas as demais amostras (17066, 58054 e 146098) foi verificado que este gene não estava sendo transcrito para algumas amostra mutantes selecionadas com os outros β -lactâmicos e, para outras amostras a sua transcrição foi menor que a da amostra selvagem. Isso pode ser explicado, uma vez que *Acinetobacter* spp. contendo IS_{ABA-1} pode ter uma vantagem seletiva quando a sua sobrevivência for dependente na expressão eficiente de uma variedade de genes de resistência,

como por exemplo a hiperprodução de β -lactamase do tipo AmpC. Entretanto, estudos analisando a presença dessa IS seriam necessários para melhor esclarecer a resistência aos β -lactâmicos entre as amostras mutantes resistentes avaliadas no presente estudo.

Outro mecanismo de resistência que avaliamos pela qRT-PCR foi a expressão do gene que codifica algumas proteínas de membrana externa. A primeira porina avaliada foi a OmpA, que pertence a maior família de proteínas de membrana externa, desempenhando um importante papel na entrada dos β -lactâmicos na célula bacteriana. Com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se verificar que quase todas as amostras tiveram uma diminuição na transcrição gênica para a proteína de membrana externa OmpA, o que explicaria a diminuição da entrada do β -lactâmico na célula bacteriana. Apenas para os mutantes das bactérias 30078 e 170066, selecionados com os antimicrobianos ceftazidima e cefepima, observou-se um aumento de seis vezes e uma vez, respectivamente, na transcrição do gene. A segunda análise de expressão gênica foi realizada para a proteína de membrana externa CarO. Essa proteína parece estar envolvida com a resistência aos carbapenems. Entretanto, Vila e colaboradores (2007) relataram que a proteína de membrana externa CarO pode funcionar como um canal de entrada inespecífico para carbapenems na célula bacteriana. Os resultados revelam que para todas as amostras mutantes avaliadas para os carbapenems, no presente estudo, foi observada uma diminuição na expressão do gene que codifica a proteína de membrana externa *carO*. Essa diminuição variou de 0,2 a duas vezes quando as amostras mutantes foram comparadas às amostras selvagens.

Foi avaliada também a transcrição gênica do gene *ompW*, que codifica uma terceira proteína de membrana externa denominada OmpW, que foi recentemente, associada a resistência *in vitro* para colistina entre amostras mutantes de *A. baumannii* (Vila *et al.*, 2007). Apenas para uma única amostra os resultados da qRT-PCR mostra uma diminuição de três vezes do transcrito gênico para OmpW para a mutante no valor da MIC quando comparada com a amostra selvagem. Por outro lado, quando avaliamos a mesma amostra para a mutante no valor da MPC, essa transcrição foi cinco vezes maior, quando comparada com a amostra mutante isolada no valor da MIC. Entretanto, para todas as outras amostras mutantes de polimixina avaliadas no presente estudo para OmpW, não foi possível detectar a transcrição gênica do gene que codifica esta proteína de membrana externa, e as mutantes (MIC e MPC) do isolado 17068, que apresentava MIC para polimixina de 4 µg/mL, não foram recuperadas do banco de microrganismo, não sendo possível avaliá-las.

Apesar dos mecanismos de resistência às polimixinas em *Acinetobacter* spp. ainda não terem sido completamente elucidados, recentemente, um estudo realizado por Adams e colaboradores descreveram mutação em dois genes regulatórios, *pmrA* e *pmrB*. Estes genes parece estar envolvidos na regulação da resistência a polimixina em *A. baumannii*, podendo assim explicar o mecanismo adaptativo que as bactérias desenvolvem frente a um contato prolongado com a polimixina (Adams *et al.*, 2009). Entretanto, estudo adicionais ainda são necessários para esclarecer se houve realmente a seleção de mutantes resistentes ou se houve uma modificação em toda população bacteriana apenas pela presença da polimixina B.

Por último, um outro mecanismo de resistência de suma importância avaliado no presente estudo foi a expressão gênica do sistema de bomba de efluxo AdeAB. Essa bomba de efluxo possui atividade contra diversos antimicrobianos, como aminoglicosídeos, β -lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclinas e pode estar associado à diminuição da sensibilidade às fluoroquinolona. Os nossos resultados mostram que a transcrição gênica do gene *adeB* foi maior para as amostras selecionadas com as fluoroquinolonas. Para o antimicrobiano levofloxacina, na amostra mutante no valor da MIC (30078), apresentou uma transcrição gênica 10 vezes maior quando comparado com a amostra selvagem, seguida pela mutante no valor da MIC para ciprofloxacina (30078), que foi três vezes mais transcrito, quando comparamos com a amostra selvagem. Já, entre os antimicrobianos β -lactâmicos a amostra mutante no valor da MIC para imipenem (30078), observamos um aumento de duas vezes a sua transcrição quando comparamos com a amostra selvagem.

Como os resultados obtidos no presente estudo foram distintos daqueles reportados e contrastam com aqueles esperados (Smith, 2003; Almeida, 2007; Pasquali, 2008; Nakamura, 2009), os nossos achados levaram a questionar se outros mecanismos de resistência não avaliados poderiam estar presentes, ou se realmente a técnica da MPC seria um fenômeno observado apenas *in vitro*. Baseado nos nossos resultados o conceito da MPC parece ser um fenômeno observado *in vitro* que não corresponderia ao que observamos clinicamente, como, se tomarmos como exemplo as polimixinas. Portanto, estudos adicionais são necessários a fim de avaliar se os nossos resultados são reprodutíveis e para melhor esclarecer o comportamento das amostras mutantes resistentes de *Acinetobacter* spp.

6. Conclusões

1. Os antimicrobianos que apresentaram a menor relação MPC:MIC entre as amostras de *Acinetobacter* spp. foi polimixina B seguido pela quinolona levofloxacina.
 2. Não foi detectada nenhuma mutação nas regiões determinantes de resistência às quinolonas dos genes *gyrA* e *parC* entre as amostras de *Acinetobacter* spp. mutantes avaliadas no presente estudo.
 3. O perfil das proteínas da membrana externa avaliadas nas amostras mutantes resistentes não apresentou nenhuma alteração entre todas as amostras de *Acinetobacter* spp. avaliadas no presente estudo.
 4. A hiperprodução de β -lactamases do tipo AmpC entre os antimicrobianos β -lactâmicos foi detectada apenas entre os mutantes da amostra 30078 quando selecionas com imipenem e meropenem.
-

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, Bonomo RA. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(9):3628-34.

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; 45:583-8.

Almeida D, Nuermberger E, Tyagi S, Bishai WR, Grosset J. In vivo validation of the mutant selection window hypothesis with moxifloxacin in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(12):4261-6.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289:321-331.

Anstey NM, Currie BJ, Withnall KM. Community-acquired *Acinetobacter pneumoniae* in the northern territory of Australia. *Clin Infect Dis* 1992; 14:83-91.

Anstey NM, Currie BJ, Hassell M, Palmer D, Dwyer B, Seifert H. Community-acquired bacteremic *Acinetobacter pneumoniae* in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *J Clin Microbiol* 2002; 40:685-6.

- Anstey NM, Currie BJ, Withnall KM. Community-acquired *Acinetobacter* pneumonia in the Northern Territory of Australia. *Clin Infect Dis* 1992; 14:83-91.
- Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S et al. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1612-5.
- Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M, Hoiby N. Constitutive high expression of chromosomal β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(11):3406-11.
- Baquero, F. & Negri, M. C. Strategies to minimize the development of antibiotic resistance. *Journal of Chemotherapy* 1997; 9(3):29–37.
- Baquero F. Resistance to quinolones in Gram-negative microorganisms: mechanisms and prevention. *European Urology* 1990; 17: 3-12.
- Baumann P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J Bacteriol* 1968a; 96:39-42.
- Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. Study of the *Moraxella* group. I. Genus *Moraxella* and the *Neisseria catarrhalis* group. *J Bacteriol* 1968b; 95:58-73.
- Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol* 1968c; 95:1520-41.
-

- Bergogne-Berezin E. *Acinetobacter* spp., saprophytic organisms of increasing pathogenic importance. *Zentralbl Bakteriol* 1994; 281:389-405.
- Bergogne-Bérézin E. & Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clinical Microbiology Reviews* 1996; 2:148–65.
- Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL. Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *J Hosp Infect* 1999; 42:201-4.
- Bernards AT, van der TJ, van Boven CP, Dijkshoorn L. Evaluation of the ability of a commercial system to identify *Acinetobacter* genomic species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:303-8.
- Bifulco JM, Shirey JJ, Bissonnette GK. Detection of *Acinetobacter* spp. in rural drinking water supplies. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55:2214-9.
- Blondeau JM, Hansen G, Metzler K, Hedlin P. The role of PK/PD parameters to avoid selection and increase of resistance: mutant prevention concentration. *J Chemother* 2004;16 Suppl 3:1-19.
- Blondeau JM, Zhao X, Hansen G, Drlica K. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(2):433-8.
- Bonten MJ. Infection in the intensive care unit: prevention strategies. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15:401-5.
-

- Bou G, Martinez-Beltran J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000a; 44:428-32.
- Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24 a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000b; 44:1556-61.
- Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987; 138:569-78.
- Bovre K. Family *Neisseriaceae*. In: Krieg NR, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Md: The Williams & Williams, 1984: 288-309.
- Bingen E, Lambert-Zechovsky N, Mariani-Kurkdjian P, *et al.*, Bacterial counts in cerebrospinal fluid of children with meningitis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1990; 9: 278-281.
- Buijs J, Dofferhoff AS, Mouton JW, Wagenvoort JH, van der Meer JW. Concentration-dependency of beta-lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Apr;14(4):344-9. Epub 2008 Feb 5.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-33.
-

Bush K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1085-9.

Buxton AE, Anderson RL, Werdergard D. Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus*: epidemiologic characteristics. *Am J Med* 1978; 65:507-13.

Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Albertí S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*. 2004; ;72(12):7107-14.

Carr E, Seviour RJ, Gurtler V. Genomic fingerprinting of the 16S-23S gene spacer region suggests that novel *Acinetobacter* isolates are present in activated sludge. *Water Sci Technol* 2002; 46:449-52.

Christner BC, Mosley-Thompson E, Thompson LG, Reeve JN. Bacterial recovery from ancient glacial ice. *Environ Microbiol* 2003; 5:433-6.

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; 45:710-4.

Clausell A, Garcia-Subirats M, Pujol M, Busquets MA, Rabanal F, Cajal Y. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. *J Phys Chem B*. 2007; 111(3):551-63.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement, document M100-S16. Wayne, PA, USA: CLSI, 2006a.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard, M7-A7. Wayne, PA, USA: CLSI, 2006a.

Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:629-35.

Da Silva GJ, Quinteira SBE, Sousa C, Gallego L, Duarte A, Peixe L. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54:255-8.

Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier KL, *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3403-6.

Danes C, Navia MM, Ruiz J, Marco F, Jurado A, Jimenez de Anta MT *et al.* Distribution of β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (AmpC inhibitor) on the MICs of different beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50:261-4.

- Debast SB, Meis JF, Melchers WJ, Hoogkamp-Korstanje JA, Voss A. Use of interrepeat PCR fingerprinting to investigate an *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *Scand J Infect Dis* 1996; 28:577-81.
- Dijkshoorn L, Van Harselaar B, Tjernberg I, Bouvet PJ, Vaneechoutte M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Syst Appl Microbiol* 1998; 21:33-9.
- Dima S, Kritsotakis EI, Roubelaki M, Metalidis S, Karabinis A, Maguina N, Klouva F, Levidiotou S, Zakyntinos E, Kioumis J, Gikas A. Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units in Greece. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007 May;28(5):602-5.
- Dong Y, Zhao X, Kreiswirth BN, Drlica K. Mutant prevention concentration as a measure of antibiotic potency: studies with clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(9):2581-4.
- Dong Y, Zhao X, Domagala J, Drlica K. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7):1756-8.
- Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated. *Clin Infect Dis*. 2007; 44(5):681-8.
- Drlica K, Zhao X, Blondeau JM, Hesje C. Low correlation between MIC and mutant prevention concentration. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(1):403-4.
-

Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003;52(1):11-7.

Drlica K. A Strategy for Fighting Antibiotic Resistance. *ASM News* 2001; 67:27-33.

Ehrenstein B, Bernards AT, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner KJ, Bouvet PJ et al. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2414-20.

Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother* 1999; 33(9):960-7.

Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo Mf MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between β -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:565-74.

Forster DH, Daschner FD. *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:73-7.

Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis*. 2006; 42(5):692-9.

Galani I, Souli M, Chryssouli Z, Katsala D, Giamarellou H. First identification of an *Escherichia coli* clinical isolate producing both metallo-beta-lactamase VIM-2

and extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. *Clin Microbiol Infect* 2004; 757-60.

Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin Infect Dis* 2001; 32 Suppl 2:S104-S113.

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; 45:77-9.

Gales AC, Sader HS, Sinto S, Santos OP, Mendes CM. In vitro activity of ampicillin-sulbactam against clinical multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Chemother* 1996; 8:416-419.

Gervich DH, Grout CS. An outbreak of nosocomial *Acinetobacter* infections from humidifiers. *Am J Infect Control* 1985; 13:210-5.

Getschel-White SI, Donowitz LG, Groschel DHM. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1989; 10:402-6.

Gradon DJ, Chapnick EK, Lutwick LI. Infective endocarditis due to *Acinetobacter*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1992; 14:1145-8.

Gribun A, Nitzan Y, Pechatnikov I, Hershkovits G, Katcoff DJ. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol.* 2003; 47(5):434-43.

Gugel J, Dos Santos Pereira A, Pignatari AC, Gales AC. beta-Lactam MICs correlate poorly with mutant prevention concentrations for clinical isolates of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(6):2276-7.

Guzman-Blanco M, Casellas JM, Sader HS. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The giant is awakening. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 14:67-81.

Hansen GT. *The Mutant-Prevention Concentration (MPC): Ideas for restricting the development of fluoroquinolone resistance*. Thesis submitted to the College of Graduate Studies and Research in partial fulfillment of the requirements for the Doctoral Degree of Science in the Department of Microbiology and Immunology University of Saskatchewan. Saskatoon, 2005.

Hansen GT, Metzler K, Drlica K, Blondeau JM. Mutant prevention concentration of gemifloxacin for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(1):440-1.

Hansen G, Ekert L, Metzler K, Blondeau J. Comparison of the minimal inhibitory concentration, mutation prevention concentration, and minimum bactericidal concentration of ciprofloxacin and levofloxacin against enteric gram-negative bacilli. *42rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemoteraphy* [E-70], 2002a. *Abstract*

Hernandes SED, Mello AC, Sant'Ana JJ, Soares VS, Cassiolato V, Garcia LB, et al. The effectiveness of alcohol gel and others hand-cleansing agents against important nosocomial pathogens. *Braz J Microbiol* 2004; 35:33-9.

Harmsen D, Singer C, Rothganger J, Tonjum T, de Hoog GS, Shah H et al. Diagnostics of *neisseriaceae* and *moraxellaceae* by ribosomal DNA sequencing: ribosomal differentiation of medical microorganisms. *J Clin Microbiol* 2001; 39:936-42.

Hartstein, AI, Rashad AL, Liebler JM, Actis LA, Freeman J, Rourke JW, Stibolt TB, Tolasky M, Ellus GR, Crosa JH. Multiple intensive care unit outbreak of *Acinetobacter calcoaceticus* subspecies *anitratus* respiratory infection and colonization associated with contaminated reusable ventilator circuits and resuscitation bags. *Am J Med* 1988; 85:624-31.

Henriksen SD. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriol Rev* 1973; 37:522-61.

Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquire carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005a; 49:3198-202.

- Héritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Rauolt D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacilinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005b; 49:4174-9.
- Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D et al. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 821–3.
- Hoffman S, Mabeck CE, Vejlsgaard D. Bacteriuria caused by *Acinetobacter calcoaceticus* biovars in a normal population and in general practice. *J Clin Microbiol* 1982; 16:443-51.
- Hong H, Patel DR, Tamm LK, van den Berg B. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel. *J Biol Chem*. 2006; 281(11):7568-77.
- Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 2001;7(2):337-41.
- Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2000; 31:S24-8.
- Hovde LB, Rotschafer SE, Ibrahim KH, Gunderson B, Hermsen ED, Rotschafer JC. Mutation prevention concentration of ceftriaxone, meropenem, imipenem, and ertapenem against three strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45(4):265-7.
-

Hujer KM, Hunjer AM, Hultler EA, Bajaksouzian S, Adams JM, *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; 5:4114-23.

Jacobs C, Joris B, Jamim M, Klarsov K, Van Beeumen J, Mengin-Lecreux D, Van Heijenoort J, Park JT, Normark S, Frère JM. AmpD, essential for both beta-lactamase regulation and cell recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Molecular Microbiology* 1995; 15(3):553-9.

Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36:1938-41.

Jeong SH, Bae IK, Park KO, An YJ, Sohn SG, *et al.* Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. *J Microbiol* 2006; 44:423-31.

Joly-Guillou ML, Decre D, Bergogne-Bérézin E. Infections nosocomiales à *Acinetobacter*: surveillance épidémiologique hospitalière. *Bull Epidemiol Hebd* 1992; vi: 211-2.

Jones A, Morgan D, Walsh A, Turton J, Livermore D, *et al.*, Importation of multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. Infections with casualties from Iraq. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:317-8.

Jones RN, Pfaller MA. Bacterial resistance: a worldwide problem. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31:379-88.

Jones RN. Important and emerging β -lactamase-mediated resistances in hospital-based pathogens: the AmpC enzymes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 1998; 31(3):461-6.

Jones RN. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest* 2001; 119:397S-404S.

Juni E. Interspecies transformation of *Acinetobacter* genetic evidence for a ubiquitous genus. *J Bacteriol* 1972; 112:917-31.

Kanemoto K, Ogawa R, Kurishima K, Ishikawa H, Ohtsuka M, Sekizawa K. Severe community-acquired *Acinetobacter* pneumonia. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2003; 41:817-21.

Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1681-8.

Koch-Weser J, Sidel VW, Federman EB, Kanarek P, Finer DC, Eaton AE. Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Ann Intern Med* 1970; 72:857-868.

- Kuga A, Okamoto R, Inoue M. *ampR* gene mutations that greatly increase class C beta-lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44(3):561-7
- Langae TY, Gagnon L, Huletsky A. Inactivation of the *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC β -lactamase expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(3):583-9.
- Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santucci P, Meunier C, de Pauw E, et al. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(4):902-6.
- Laraki N, Galleni M, Thamm I, Riccio ML, Amicosante G, Frere JM et al. Structure of In31, a blaIMP-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phyletically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999b; 43:890-901.
- 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- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7):1584-90.
- Levin AS. Treatment of Acinetobacter spp infections. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4:1289-1296.
-

- Levin AS, Barone AA, Penco J, Santos MV, Marinho IS, Arruda EA et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 1999; 28:1008-1011.
- Li X, Zhao X, Drlica K. Selection of *Streptococcus pneumoniae* mutants having reduced susceptibility to levofloxacin and moxifloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:522–4.
- Libisch B, Gacs M, Csiszar K, Muzslay M, Rokusz L, Fuzi M. Isolation of an integron-borne blaVIM-4 type metallo-beta-lactamase gene from a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Hungary. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(9):3576-8.
- Linde HJ, Lehn N. Mutant prevention concentration of nalidixic acid, ciprofloxacin, clinafloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, sparfloxacin or trovafloxacin for *Escherichia coli* under different growth conditions. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53(2):252-7.
- Livermore DM. Overstretching the mutant prevention concentration. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(4):732; author reply 732-3.
- Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34(5):634-40.
- Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:247-250.
-

Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-84.

Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis* 1991; 78:7-16.

Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, Quinn JP. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:2941-5.

Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4741-3.

Low D. Antimicrobial drug use and resistance among respiratory pathogens in the community. *Clinical and Infectious Diseases* 2001; 33: S206-S213.

Lu T, Zhao X, Li X, Hansen G, Blondeau J, Drlica K. Effect of chloramphenicol, erythromycin, moxifloxacin, penicillin and tetracycline concentration on the recovery of resistant mutants of *Mycobacterium smegmatis* and *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(1):61-4.

Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3375–80.

Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P et al. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3298–304.

Marcusson LL, Olofsson SK, Komp Lindgren P, Cars O, Hughes D. Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin for urinary tract infection isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2005;55(6):938-43.

Marques S, Poirel L, Heritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R, Coman G, Naas T, Nordmann P. Regional occurrence of plasmidmediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4885–8.

Mathur J, Waldor MK. The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*. 2004; 72(6):3577-83.

McDonald LC, Banerjee SN, Jarvis WR. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987-1996. Nosocomial Infections Surveillance System. *Clin Infect Dis* 1999; 29:1133-7.

Medeiros AA. β -lactamases. *Br Med Bull* 1984; 40:18-27.

Mendes RE, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman MA, Walsh TR, et al. First isolation of bla(VIM-2) in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(4):1433-4.

Merkier AK, Centron D. *bla*_{OXA-51}- type beta-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain *Acinetobacter baumannii*. *Int J. Antimicrob Agents* 2006; 28:110-3.

Montefour K; Frieden J; Hurst S; Helmich C; Headley D; Martin M; Boyle DA. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. *Crit Care Nurse* 2008; 28(1):15-25.

Moran GJ, Mount J. Update on emerging infections: news from the Centers for Disease Control and Prevention. *Ann Emerg Med* 2003; 41:148-51.

Morgan ME & Hart CA. *Acinetobacter meningitidis*. Acquired in neonatal intensive care unit. *Arch Dis Child* 1982; 57:557-9.

Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med*. 2008 Mar 20;358(12):1271-81.

Musa EK, Desai N, Casewell MW. The survival of *Acinetobacter calcoaceticus* inoculated on fingertips and on formica. *J Hosp Infect* 1990; 15:219-27.

Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Apr;49(4):1432-40.

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; 43:4826-9.

Nakamura S, Yanagihara K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S. Comparative mutant prevention concentration and mutant selection window of sitafloxacin versus other quinolones using strains of *Haemophilus influenzae* with decreasing susceptibility to levofloxacin. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 May;33(5):489-90.

Nemec A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, Van Der Reijden TJ *et al.* *Acinetobacter parvus* sp. a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53:1563-7.

Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67(4):593-656.

Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12:215-23.

Nikaido H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem* 1994; 269:3905-3908.

Nitzan Y, Deutsch EB, Pechatnikov I. Diffusion of beta-lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. *Curr Microbiol* 2002; 45:446-55.

- Nitzan Y, Pechatnikov I, Bar-El D, Wexler H. Isolation and characterization of heat-modifiable proteins from the outer membrane of *Porphyromonas asaccharolytica* and *Acinetobacter baumannii*. *Anaerobe*. 1999; 5(1):43-50.
- Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8:321-331. Normark S. beta-Lactamase induction in gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. *Microbiology Drug Resistance* 1995; 1(2):111-4.
- Obara M, Nakae T. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28:791-800.
- Ouderkirk JP, Nord JA, Turett GS, Kislak JW. Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infections caused by multiresistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2659-2662.
- Pagel JE & Seyfried PL. Numerical taxonomy of aquatic *Acinetobacter* isolates. *J Gen Microbiol* 1976; 95:220-32.
- Parr EL, Parr MB, Young JD. Localization of a pore-forming protein (perforin) in granulated metrial gland cells. *Biol Reprod* 1987; 37:1327-1335.
- Pasquali F, Manfreda G. Mutant prevention concentration of ciprofloxacin and enrofloxacin against *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Vet Microbiol*. 2007; 119:304-10
-

- Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993; 2(2):81-7.
- Patzer J, Toleman MA, Deshpande LM, Kaminska W, Dzierzanowska D, Bennett PM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*_{VIM-4} gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). *J Antimicrob Chemother* 2004; 53(3):451-6.
- Pawar M, Mehta Y, Khurana P, Chaudhary A, Kulkarni V, Trehan N. Ventilator-associated pneumonia: Incidence, risk factors, outcome, and microbiology. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2003; 17:22-8.
- Peleg AY, Bell JM, Hofmeyr A, Wiese P. Inter-country transfer of gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58 carbapenem-hydrolyzing enzymes. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:794–5.
- Petukhov VN, Fomchenkov VM, Chugunov VA, Kholodenko VP. Plant biotests of soil and water, polluted with petroleum and petroleum products. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2000; 36:652-5.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): 2003-2007.
- Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46(1):1-11.
-

- Pillay T, Pillay DG, Adhikari M, Pillay A, Sturm AW. An outbreak of neonatal infection with *Acinetobacter* linked to contaminated suction catheters. *J Hosp Infect* 1999; 43:299-304.
- Pina P, Guezenec P, Grosbuis S, Guyot L, Ghnassia JC, Allouch PY. An *Acinetobacter baumannii* outbreak at the Versailles Hospital Center. *Pathol Biol (Paris)* 1998; 46:385-94.
- 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; 2(4):1252-6.
- Poirel L, Corvec S, Rapoport M, Mugnier P, Petroni A, Pasteran F, Faccone D, Galas M, Drugeon H, Cattoir V, Nordmann P. Identification of the novel narrow-spectrum beta-lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(6):2179-84.
- Poire L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006a; 12:826–36.
- Poirel L, Lebessi E, Heritier C, Patsoura A, Foustoukou M, Nordmann P. Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2006b; 12:1138–41.
-

- Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3542-7.
- Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing β -lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; 3:117-27.
- Poole K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002; 3(2):77-98.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul; 20(3):440-58.
- Quale J, Bratu S, Landman D, Heddurshetti R. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin Infect Dis* 2003; 37:214-220.
- Quinn B, Hussain S, Malik M, Drlica K, Zhao X. Daptomycin inoculum effects and mutant prevention concentration with *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(6):1380-3.
- Randall LP, Cooles SW, Piddock LJ, Woodward MJ. Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin and enrofloxacin for *Salmonella enterica*. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54(3):688-91.
- Recchia GD, Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 1995; 141:3015-27.
-

Reis AO, Luz DA, Tognim MC, Sader HS, Gales AC. Polymyxin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates: what is next? *Emerg Infect Dis* 2003; 9:1025-1027.

Retailliau HF, Hightower AW, Dixon RE, Allen JR. *Acinetobacter calcoaceticus*: a nosocomial pathogen with an unusual seasonal pattern. *J Infect Dis* 1979; 139: 371-5.

Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca R, Pascual A, Vila J. High prevalence of carbapenem-hydrolyzing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13:1192–8.

Russo TA, MacDonald U, Beanan JM, Olson R, MacDonald IJ, Sauberan SL, Luke NR, Schultz LW, Umland TC. Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. *J Infect Dis*. 2009; 199(4):513-21.

Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59(5):1001-4.

Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 2001; 5:200-214.

Sader HS, Sampaio JL, Zoccoli C, Jones RN. Results of the 1997 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in Three Brazilian Medical Centers. *Braz J Infect Dis* 1999; 3:63-79.

Sader HS, Jones RN, Gales AC, Klugler K, Pfaller MA, Doern GV, and the SENTRY Latin America Study Group. Antimicrobial susceptibility of patterns for pathogens isolated from patients in Latin American medical centers with a diagnosis of pneumonia: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997). *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 1998a; 38:289-301.

Sader HS, Ferreira AT, Tosin I, I, Gales AC, Keim LS, Carbadillo JM et al. Piperacillin/Tazobactam: Evaluation of Its In vitro Activity against Bacteria Isolated in Two Brazilian Hospitals and an Overview of Its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Potential. *Braz J Infect Dis* 1998b; 2:241-255.

Salazar D, Nievesm VB, Ruiz M, Ruiz J, Vila J, Maria A, Elsa V. Molecular epidemiology and characterization of resistance mechanisms to various antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii* isolated in Merida, Venezuela. *Med Sci Monit* 2007; 13:BR89–BR94.

Sanders CC, Bradford PA, Ehrhardt AF, Bush K, Young KD, Henderson TA, Sanders WE Jr. Penicillin-binding proteins and induction of AmpC beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41(9):2013-5.

Sato K, Nakae T. Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28:35-45.

Schloesser RL, Laufkoetter EA, Lehnert T, Mietens C. An outbreak of *Acinetobacter calcoaceticus* infection in a neonatal care unit. *Infection* 1990; 18:230-3.

Segal H, Jacobson RK, Garny S, Bamford CM, Elisha BG. Extended -10 promoter in ISAb_a-1 upstream of bla_{OXA}-23 from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(8):3040-1.

Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* in blood cultures. *Int J Med Microbiol* 1992; 277: 210-8.

Seifert H, Strate A, Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine (Baltimore)* 1995; 74:340-9.

Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S et al. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (bla_{IMP}) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2909-13.

Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S et al. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (bla_{IMP}) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2909-13.

Sherertz RJ & Sullivan ML. An outbreak of infections with *Acinetobacter calcoaceticus* in burn patients: contamination of patients' mattresses. *J Infect Dis* 1985; 151:252-8.

Sherertz RJ, Sullivan ML. An outbreak of infections with *Acinetobacter calcoaceticus* in burn patients: contamination of patients' mattresses. *J Infect Dis* 1985; 151:252-8.

Sindelar G, Zhao X, Liew A, Dong Y, Lu T, Zhou J, *et al.* Mutant prevention concentration as a measure of fluoroquinolone potency against mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(12):3337-43.

Siroy A, Molle V, Lemaître-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ, Jouenne T, Dé E. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(12):4876-83.

Smego RA Jr. Endemic nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus* bacteremia. Clinical significance, treatment, and prognosis. *Arch Intern Med* 1985, 145: 2174-9.

Smith HJ, Nichol KA, Hoban DJ, Zhanel GG. Stretching the mutant prevention concentration (MPC) beyond its limits. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(6):1323-5.

- Spence RP, Towner KJ. Frequencies and mechanisms of resistance to moxifloxacin in nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:687-90.
- Spratt BG & Cromie KD. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis* 1988; 10(4):699-711.
- Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem* 1977; 46:723-763.
- Su XZ, Chen J, Mizushima T *et al.* AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4362-4.
- Sureda A, Pascual J, Sanchez-Ruano J, Cano A, Boixeda D. Péritonite bactérienne spontanée par l'*Acinetobacter calcoaceticus*. *Presse Méd* 1988; 17:2137-8.
- Tognim MCB, Andrade SS, Silbert S, Gales AC, Jones RN, Sader HS. Resistance Trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and Characterization of International Dissemination of Multi-Drug Resistant Strains: 5-Year Report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Infect Dis*. 2004; 8(5):284-91.
- Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. *bla*_{VIM-7}, an evolutionarily distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1):329-32.
-

Tomás MM, Beceiro A, Pérez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, Martínez-Beltrán J, Bou G. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(12):5172-5.

Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TI. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006a; 44:2974-6.

Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TI. The role of ISAb_a I in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006b; 258:72-7.

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

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

Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A *et al*. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2265-9.

Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007 Jun; 59(6):1210-5.

Vila J, Ribera A, Marco F, Ruiz J, Mensa J, Chaves J et al. Activity of clinafloxacin, compared with six other quinolones, against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:471-7.

Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24:284-95.

Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:2001-4.

Von Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *In: Manual of clinical microbiology*. ASM Press: Washington DC, USA; 1995. p. 520-21

Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying *bla_{VIM-2}* in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 2003;52(1):116-9.

Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(3):373-83.

Wang H, Guo P, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M, Xu Y, Zhu Y. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. From Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(11):4022-8.

Wang JT, McDonald LC, Chang SC, Ho M. Community-acquired *Acinetobacter baumannii* bacteremia in adult patients in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1526-9.

Warskow AL & Juni E. Nutritional requirements of *Acinetobacter* strains isolated from soil, water, and sewage. *J Bacteriol* 1972; 112:1014-6.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(1):147-51.

Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Jan;51(1):9-11.

Westh H, Christensen JJ, Blom J, Frederiksen W. Fatal septicemia with *Selenomonas sputigena* and *Acinetobacter calcoaceticus*. *APMIS* 1991; 99:75-7.

Wiese A, Munstermann M, Gutschmann T, Lindner B, Kawahara K, Zahringer U et al. Molecular mechanisms of polymyxin B-membrane interactions: direct correlation between surface charge density and self-promoted transport. *J Membr Biol* 1998; 162:127-138.

Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemase in *Acinetobacter* spp. *Int. J Antimicrob Agents* 2006; 27:351-3.

Yamazaki E, Ishii J, Sato K, Nakae T. The barrier function of the outer membrane of *Pseudomonas maltophilia* in the diffusion of saccharides and beta-lactam antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 1989; 51:85-88.

Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K *et al.* High prevalence of PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1749-51.

Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(6):1206-15.

Zeana C, Larson E, Sahni J, Bayuga SJ, Wu F, Della-Latta P. The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: does the community represent a reservoir?. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24:275-9.

Zhou H, Pi BR, Yang Q, Yu YS, Chen YG, Li LJ, Zheng SS. Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain carrying the ISAbal *bla*_{OXA-23} genes in a Chinese hospital. *J Med Microbiol* 2007; 56:1076-80.

Zhao X & Drlica K. A unique anti-mutant dosing strategy. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:434-6.

Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: measurement and potential use of the mutant selection window. *J Infect Dis* 2002;185(4):561-5.

Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis* 2001;33 Suppl 3:S147-56.

Resumo

Acinetobacter baumannii constitui um importante patógeno oportunista em hospitais brasileiros. Uma característica comum desta bactéria é a resistência intrínseca a múltiplos antimicrobianos. Estratégias como a racionalização do uso e o rodízio de antimicrobianos têm sido aplicadas com o objetivo de minimizar o desenvolvimento de resistência bacteriana. Porém, apesar da utilização destas medidas, o número de relatos de amostras de *A. baumannii* multirresistentes tem aumentado consideravelmente. Uma nova estratégia para evitar o surgimento de bactérias resistentes tem sido proposta. Trata-se da utilização clínica de antimicrobianos que selecionem o menor número de bactérias mutantes resistentes. Este conceito baseia-se na determinação da menor concentração de antimicrobiano que previne o surgimento de bactérias mutantes resistentes, a MPC. O principal objetivo deste estudo será determinar os antimicrobianos que possuem a menor relação MPC:MIC, concentração inibitória mínima, entre as amostras de *Acinetobacter* spp. e, dessa maneira, distinguir os antimicrobianos capazes de menos selecionar e favorecer o crescimento de bactérias resistentes. Foram avaliadas 20 amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. obtidas do Banco de Microrganismo do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de São Paulo/EPM. Inicialmente, o perfil de sensibilidade aos diversos antimicrobianos foi determinado pela técnica de disco difusão com o objetivo de selecionar as amostras sensíveis às fluoroquinolonas,

cefalosporinas de amplo espectro, carbapenens e polimixinas. Posteriormente, as amostras sensíveis tiveram o seu perfil de sensibilidade determinado pela técnica de ágar diluição. A MPC será determinada como a menor concentração de antimicrobiano capaz de prevenir o crescimento bacteriano, utilizando-se um inóculo superior a 10^{10} UFC/ml semeado em placas com diferentes concentrações dos diversos antibióticos testados. Além da determinação da MPC, os mecanismos de resistência às quinolonas, polimixinas e cefalosporinas de amplo espectro das amostras bacterianas mutantes também foram avaliados.

Anexo I- Espécies de *Acinetobacter* descritas. Ultimo Acesso 12/03/2009AcinetobacterAcinetobacter baumannii

- Acinetobacter baumannii 19606
- Acinetobacter baumannii AB0057
- Acinetobacter baumannii AB307-0294
- Acinetobacter baumannii AB900
- Acinetobacter baumannii ACICU
- Acinetobacter baumannii ATCC 17978
- Acinetobacter baumannii AYE
- Acinetobacter baumannii MDR-ZJ06
- Acinetobacter baumannii SDF
- Acinetobacter baumannii WBA9388
- Acinetobacter baumannii WBL7215
- Acinetobacter baumannii WBL7355

Acinetobacter baylyiAcinetobacter beijerinckiiAcinetobacter bouvetiiAcinetobacter brisouiAcinetobacter calcoaceticus

- Acinetobacter calcoaceticus RUH2202

- Acinetobacter calcoaceticus subsp. anitratus

Acinetobacter genomosp. 10Acinetobacter genomosp. 11Acinetobacter genomosp. 12Acinetobacter genomosp. 13

- Acinetobacter sp. BM2716

Acinetobacter genomosp. 13BJAcinetobacter genomosp. 13TU

- Acinetobacter sp. RUH2624

Acinetobacter genomosp. 14Acinetobacter genomosp. 14BJAcinetobacter genomosp. 14TUAcinetobacter genomosp. 15Acinetobacter genomosp. 15BJAcinetobacter genomosp. 15TUAcinetobacter genomosp. 16Acinetobacter genomosp. 16BJAcinetobacter genomosp. 17Acinetobacter genomosp. 17BJAcinetobacter genomosp. 3

- Acinetobacter sp. 4365

- Acinetobacter sp. SH024

Acinetobacter genomosp. 6Acinetobacter genomosp. 9Acinetobacter genomosp. C1Acinetobacter gerneriiAcinetobacter glutaminasificansAcinetobacter grimontiiAcinetobacter gyllenbergiiAcinetobacter haemolyticus

Acinetobacter johnsonii
Acinetobacter johnsonii SH046
Acinetobacter junii
Acinetobacter junii SH205
Acinetobacter lwoffii
Acinetobacter lwoffii K24
Acinetobacter lwoffii SH145
Acinetobacter marinus
Acinetobacter parvus
Acinetobacter psychrotolerans
Acinetobacter radioresistens
Acinetobacter radioresistens SH164
Acinetobacter radioresistens SK82
Acinetobacter rhizosphaerae
Acinetobacter schindleri
Acinetobacter seohaensis
Acinetobacter septicus
Acinetobacter soli
Acinetobacter tandoii
Acinetobacter tjernbergiae
Acinetobacter towneri
Acinetobacter ursingii
Acinetobacter venetianus
Acinetobacter xiamenensis
Acinetobacter sp.
Acinetobacter sp. 'A.d. B'
Acinetobacter sp. 'Acinet.1'
Acinetobacter sp. 'aerobic (ED)'
Acinetobacter sp. 'anoxic'
Acinetobacter sp. 'isolate 30Bi'
Acinetobacter sp. 'Mali 41'
Acinetobacter sp. 'SEIP 12.81'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0018'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0024'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0103'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0107'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0121'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0131'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0134'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0261'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0445'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0448'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0451'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0453'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0460'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0463'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0471'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0472'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0524'
Acinetobacter sp. 'SMCC B0525'
Acinetobacter sp. 00035
Acinetobacter sp. 010793814
Acinetobacter sp. 01WB03.4-44
Acinetobacter sp. 01WB03.4-63

Acinetobacter sp. 10095(LUH 1469)
Acinetobacter sp. 11
Acinetobacter sp. 11.5.051CS1
Acinetobacter sp. 11.5.051CS2
Acinetobacter sp. 11.5.051CS5
Acinetobacter sp. 11.5.051CS9
Acinetobacter sp. 11652
Acinetobacter sp. 121004
Acinetobacter sp. 122
Acinetobacter sp. 12AP21
Acinetobacter sp. 12F
Acinetobacter sp. 130704W1
Acinetobacter sp. 1722b
Acinetobacter sp. 187
Acinetobacter sp. 189
Acinetobacter sp. 18III/A01/072
Acinetobacter sp. 18III/A01/074
Acinetobacter sp. 1AS113
Acinetobacter sp. 1AS116
Acinetobacter sp. 1AS123
Acinetobacter sp. 1AS83
Acinetobacter sp. 1g
Acinetobacter sp. 1sq72
Acinetobacter sp. 2 GODO
Acinetobacter sp. 2.0.41
Acinetobacter sp. 2.60.71
Acinetobacter sp. 20
Acinetobacter sp. 2002-2301217
Acinetobacter sp. 2134
Acinetobacter sp. 220
Acinetobacter sp. 26-436-c1
Acinetobacter sp. 2697
Acinetobacter sp. 28-436-c2
Acinetobacter sp. 283
Acinetobacter sp. 297
Acinetobacter sp. 2V2D1
Acinetobacter sp. 2V3A
Acinetobacter sp. 3(14zx)
Acinetobacter sp. 3-SL3
Acinetobacter sp. 3.1
Acinetobacter sp. 30 DOGU
Acinetobacter sp. 31 DOGU
Acinetobacter sp. 33
Acinetobacter sp. 3C_8
Acinetobacter sp. 4-2
Acinetobacter sp. 407
Acinetobacter sp. 4076
Acinetobacter sp. 4077
Acinetobacter sp. 4087
Acinetobacter sp. 4088
Acinetobacter sp. 409
Acinetobacter sp. 43
Acinetobacter sp. 44 GUDO
Acinetobacter sp. 45

Acinetobacter sp. 46
Acinetobacter sp. 46 DOGU
Acinetobacter sp. 47
Acinetobacter sp. 48
Acinetobacter sp. 49
Acinetobacter sp. 4 C16 12
Acinetobacter sp. 4AS73
Acinetobacter sp. 4AS75
Acinetobacter sp. 4AS76
Acinetobacter sp. 50
Acinetobacter sp. 506
Acinetobacter sp. 508
Acinetobacter sp. 520a
Acinetobacter sp. 57 DOGU
Acinetobacter sp. 5804(LUH 1471)
Acinetobacter sp. 59 GODO
Acinetobacter sp. 5g
Acinetobacter sp. 6-SL2
Acinetobacter sp. 62 GUDO
Acinetobacter sp. 628A
Acinetobacter sp. 631
Acinetobacter sp. 640
Acinetobacter sp. 818B
Acinetobacter sp. 83NP17
Acinetobacter sp. 8637
Acinetobacter sp. 8971
Acinetobacter sp. 93A2
Acinetobacter sp. A06
Acinetobacter sp. A1
Acinetobacter sp. A115
Acinetobacter sp. A1411
Acinetobacter sp. A17
Acinetobacter sp. A2
Acinetobacter sp. A208
Acinetobacter sp. A21
Acinetobacter sp. A221
Acinetobacter sp. A32
Acinetobacter sp. a5
Acinetobacter sp. A9
Acinetobacter sp. AC149
Acinetobacter sp. AC17
Acinetobacter sp. AC18
Acinetobacter sp. AC23
Acinetobacter sp. AC25
Acinetobacter sp. AC28
Acinetobacter sp. AC35
Acinetobacter sp. AC423D
Acinetobacter sp. AC78
Acinetobacter sp. AcBz01
Acinetobacter sp. AD321
Acinetobacter sp. ADP1
Acinetobacter sp. AE24
Acinetobacter sp. AG-LSL 1
Acinetobacter sp. AG1

Acinetobacter sp. AH23
Acinetobacter sp. AK226
Acinetobacter sp. AKB-2008-4286C
Acinetobacter sp. AKB-2008-4300B
Acinetobacter sp. AKB-2008-4362A
Acinetobacter sp. AKB-2008-43671
Acinetobacter sp. AKB-2008-AU2
Acinetobacter sp. AKB-2008-AU3
Acinetobacter sp. AKB-2008-HE120
Acinetobacter sp. AKB-2008-HE124
Acinetobacter sp. AKB-2008-HE128
Acinetobacter sp. AKB-2008-HE138
Acinetobacter sp. AKB-2008-HE139
Acinetobacter sp. AKB-2008-HE140
Acinetobacter sp. AKB-2008-HE144
Acinetobacter sp. AKB-2008-HE145
Acinetobacter sp. AKB-2008-HE146
Acinetobacter sp. AKB-2008-HE21
Acinetobacter sp. AKB-2008-HE55
Acinetobacter sp. AKB-2008-JO101
Acinetobacter sp. AKB-2008-RU5
Acinetobacter sp. AKB-2008-SL10
Acinetobacter sp. AKB-2008-TE16
Acinetobacter sp. AM12
Acinetobacter sp. AMS-7
Acinetobacter sp. An17
Acinetobacter sp. AN2-06
Acinetobacter sp. An9
Acinetobacter sp. ANT9054
Acinetobacter sp. AP6M1
Acinetobacter sp. AQ5NOL_1
Acinetobacter sp. arc5
Acinetobacter sp. AS-6
Acinetobacter sp. Asd MZL2
Acinetobacter sp. ATCC 10153
Acinetobacter sp. ATCC 17910
Acinetobacter sp. ATCC 27244
Acinetobacter sp. ATCC 33308
Acinetobacter sp. AU1523
Acinetobacter sp. AU3560
Acinetobacter sp. AU783
Acinetobacter sp. AzoR-3
Acinetobacter sp. B-2-2
Acinetobacter sp. B-QPkG1
Acinetobacter sp. B.F-2
Acinetobacter sp. B0064
Acinetobacter sp. B10-4
Acinetobacter sp. B11
Acinetobacter sp. B113
Acinetobacter sp. B135
Acinetobacter sp. B13_7
Acinetobacter sp. B2
Acinetobacter sp. B3D
Acinetobacter sp. B51

Acinetobacter sp. B8-22
Acinetobacter sp. BA17
Acinetobacter sp. BA24
Acinetobacter sp. BA34
Acinetobacter sp. BAL7
Acinetobacter sp. BBN3R-01d
Acinetobacter sp. BC-02
Acinetobacter sp. BC-SM2
Acinetobacter sp. BC111
Acinetobacter sp. BC187
Acinetobacter sp. BCaL1
Acinetobacter sp. BCH290703A
Acinetobacter sp. BD413
Acinetobacter sp. BDP-96-2 2-4
Acinetobacter sp. BDP-96-2 4-2
Acinetobacter sp. BDP-96-2 5-3
Acinetobacter sp. BF-5
Acinetobacter sp. BF.51
Acinetobacter sp. BHSN
Acinetobacter sp. BJC6
Acinetobacter sp. BJS
Acinetobacter sp. BJS1
Acinetobacter sp. BJS13
Acinetobacter sp. bm-8
Acinetobacter sp. BM2722
Acinetobacter sp. bme-3
Acinetobacter sp. BMNS
Acinetobacter sp. bnj_dkc13
Acinetobacter sp. bnj_dkc23
Acinetobacter sp. bnj_dkc 28
Acinetobacter sp. bnj_dkc 29
Acinetobacter sp. bnj_dkc 33
Acinetobacter sp. bnj_dkc 42
Acinetobacter sp. BNV 36
Acinetobacter sp. BNV18
Acinetobacter sp. Bouvet382(K.Irino 105/85)
Acinetobacter sp. BP10
Acinetobacter sp. BP8
Acinetobacter sp. BR-12
Acinetobacter sp. BR-25
Acinetobacter sp. BRL02-56
Acinetobacter sp. BRL02-60
Acinetobacter sp. BS-2
Acinetobacter sp. BS8Y
Acinetobacter sp. BSA 30
Acinetobacter sp. BSA 35
Acinetobacter sp. BSA 47
Acinetobacter sp. BSA 51
Acinetobacter sp. BSL13
Acinetobacter sp. BSL2
Acinetobacter sp. BUU1
Acinetobacter sp. BUU8
Acinetobacter sp. BW
Acinetobacter sp. BW3

Acinetobacter sp. BYC2
Acinetobacter sp. BYC3
Acinetobacter sp. C-1
Acinetobacter sp. c1
Acinetobacter sp. C1010
Acinetobacter sp. C22
Acinetobacter sp. c26
Acinetobacter sp. c29
Acinetobacter sp. C3
Acinetobacter sp. c33
Acinetobacter sp. c4
Acinetobacter sp. c40
Acinetobacter sp. c43
Acinetobacter sp. c46
Acinetobacter sp. c47
Acinetobacter sp. c48
Acinetobacter sp. c53
Acinetobacter sp. c56
Acinetobacter sp. c57
Acinetobacter sp. c60
Acinetobacter sp. c61
Acinetobacter sp. c63
Acinetobacter sp. c65
Acinetobacter sp. c71
Acinetobacter sp. C896
Acinetobacter sp. c90
Acinetobacter sp. CbB3
Acinetobacter sp. CBMAI 463
Acinetobacter sp. CC-CF5
Acinetobacter sp. CC-RR1-52
Acinetobacter sp. CCBAU 15463
Acinetobacter sp. CD06
Acinetobacter sp. CF3
Acinetobacter sp. CG
Acinetobacter sp. Chang 00910
Acinetobacter sp. CHE4-1
Acinetobacter sp. CIP-A165
Acinetobacter sp. CJJH11
Acinetobacter sp. CKY4
Acinetobacter sp. CL
Acinetobacter sp. CL0205
Acinetobacter sp. CL1405
Acinetobacter sp. CL1905
Acinetobacter sp. CL2005
Acinetobacter sp. CL2105
Acinetobacter sp. CMG3032
Acinetobacter sp. cn4
Acinetobacter sp. CO
Acinetobacter sp. cont-11
Acinetobacter sp. CP
Acinetobacter sp. CP-B
Acinetobacter sp. CP-N
Acinetobacter sp. CR1
Acinetobacter sp. CR9

Acinetobacter sp. CRIB-43
Acinetobacter sp. CS3
Acinetobacter sp. CT25
Acinetobacter sp. CU27
Acinetobacter sp. CYEB-12
Acinetobacter sp. CYEB-19
Acinetobacter sp. D10
Acinetobacter sp. D1103
Acinetobacter sp. D12
Acinetobacter sp. D25
Acinetobacter sp. DB30014/96
Acinetobacter sp. dcm5A
Acinetobacter sp. DF4
Acinetobacter sp. DG-04
Acinetobacter sp. DG880
Acinetobacter sp. DH01
Acinetobacter sp. DH02-2
Acinetobacter sp. DH03-2
Acinetobacter sp. DH05
Acinetobacter sp. DH05-2
Acinetobacter sp. DH06-2
Acinetobacter sp. DH08-2
Acinetobacter sp. DH10-2
Acinetobacter sp. DH11-2
Acinetobacter sp. DH12-2
Acinetobacter sp. DH13-2
Acinetobacter sp. DH14-2
Acinetobacter sp. DH15-2
Acinetobacter sp. DH23-2
Acinetobacter sp. DH25-2
Acinetobacter sp. DH28-2
Acinetobacter sp. DH29-2
Acinetobacter sp. DH31
Acinetobacter sp. DH31-2
Acinetobacter sp. DH32-2
Acinetobacter sp. DH33-2
Acinetobacter sp. DH34-2
Acinetobacter sp. DH36-2
Acinetobacter sp. DH39-2
Acinetobacter sp. DH41-2
Acinetobacter sp. DH52-2
Acinetobacter sp. DH53-2
Acinetobacter sp. DH57-2
Acinetobacter sp. DH58-2
Acinetobacter sp. DH59-2
Acinetobacter sp. DH60-2
Acinetobacter sp. DH61-2
Acinetobacter sp. DH62-2
Acinetobacter sp. DH65-2
Acinetobacter sp. DH70-2
Acinetobacter sp. DH71-2
Acinetobacter sp. DH78-2
Acinetobacter sp. DH80-2
Acinetobacter sp. DH94-2

Acinetobacter sp. DHHS5
Acinetobacter sp. DiSz9
Acinetobacter sp. DJJH35
Acinetobacter sp. DJQD16
Acinetobacter sp. DL-28
Acinetobacter sp. DM-2005
Acinetobacter sp. DM18619/96
Acinetobacter sp. DN16
Acinetobacter sp. DN4
Acinetobacter sp. DNPA10
Acinetobacter sp. dP
Acinetobacter sp. DQ124
Acinetobacter sp. DR.Y12
Acinetobacter sp. DR1
Acinetobacter sp. DSM 11652
Acinetobacter sp. DSM 17874
Acinetobacter sp. DSM 586
Acinetobacter sp. DSP11
Acinetobacter sp. Dui-5
Acinetobacter sp. DUT AHX
Acinetobacter sp. DW112b
Acinetobacter sp. DW149
Acinetobacter sp. DZ0503SBS4
Acinetobacter sp. E-10
Acinetobacter sp. E-9
Acinetobacter sp. E23
Acinetobacter sp. E3
Acinetobacter sp. E4IPC-4005
Acinetobacter sp. E65/B
Acinetobacter sp. E929
Acinetobacter sp. EB104
Acinetobacter sp. EBR01
Acinetobacter sp. EBR02
Acinetobacter sp. ED23-35
Acinetobacter sp. ED45-25
Acinetobacter sp. EDP3
Acinetobacter sp. EH 28
Acinetobacter sp. EKN4-1
Acinetobacter sp. EMB 116
Acinetobacter sp. EMB 3
Acinetobacter sp. EN69
Acinetobacter sp. EN96
Acinetobacter sp. Epbas6
Acinetobacter sp. ES-1
Acinetobacter sp. Es12
Acinetobacter sp. EVA10
Acinetobacter sp. EVA11
Acinetobacter sp. EVA12
Acinetobacter sp. EVA13
Acinetobacter sp. EVA14
Acinetobacter sp. Everest-gws-28
Acinetobacter sp. Everest-gws-48
Acinetobacter sp. F112
Acinetobacter sp. F113

Acinetobacter sp. F166
Acinetobacter sp. F24
Acinetobacter sp. F24(2008)
Acinetobacter sp. F5
Acinetobacter sp. FH 1'
Acinetobacter sp. FH 3'
Acinetobacter sp. FH 4'
Acinetobacter sp. FH 5'
Acinetobacter sp. FL33
Acinetobacter sp. FLL7
Acinetobacter sp. FLL8
Acinetobacter sp. FP4-2
Acinetobacter sp. FR2 4
Acinetobacter sp. FR2 9
Acinetobacter sp. FS-YC6707
Acinetobacter sp. Fsh11
Acinetobacter sp. Fsh20
Acinetobacter sp. FW
Acinetobacter sp. FW12
Acinetobacter sp. G13
Acinetobacter sp. G16
Acinetobacter sp. G30
Acinetobacter sp. G3DM-29
Acinetobacter sp. g42
Acinetobacter sp. GA11-2
Acinetobacter sp. GA16
Acinetobacter sp. GA17
Acinetobacter sp. GA30-2
Acinetobacter sp. GA31
Acinetobacter sp. GA35
Acinetobacter sp. GA38
Acinetobacter sp. GA40
Acinetobacter sp. GA44
Acinetobacter sp. GA52
Acinetobacter sp. GA56
Acinetobacter sp. GA60
Acinetobacter sp. GA67
Acinetobacter sp. GA72
Acinetobacter sp. GA73
Acinetobacter sp. GB1
Acinetobacter sp. GBb22
Acinetobacter sp. GIST-MLI60
Acinetobacter sp. GIST-Out1
Acinetobacter sp. GIST-OutAn1
Acinetobacter sp. GOBB3-C105
Acinetobacter sp. GOBB3-C107
Acinetobacter sp. GW7
Acinetobacter sp. GW8
Acinetobacter sp. GXA5
Acinetobacter sp. GXA7
Acinetobacter sp. GXAN8
Acinetobacter sp. GXY-2
Acinetobacter sp. H-4
Acinetobacter sp. H1

Acinetobacter sp. H104
Acinetobacter sp. H6
Acinetobacter sp. H742
Acinetobacter sp. HB-1
Acinetobacter sp. HB1
Acinetobacter sp. HBS-2
Acinetobacter sp. Hg18B
Acinetobacter sp. Hg4-05
Acinetobacter sp. Hg4-11
Acinetobacter sp. Hi10
Acinetobacter sp. Hi7
Acinetobacter sp. Hi9
Acinetobacter sp. HIRFA32
Acinetobacter sp. HIRFA34
Acinetobacter sp. HJ2
Acinetobacter sp. HNL08
Acinetobacter sp. Hop10
Acinetobacter sp. HPC 900
Acinetobacter sp. HPC 913
Acinetobacter sp. HPC 927
Acinetobacter sp. HPC 929
Acinetobacter sp. HPC1073
Acinetobacter sp. HPC1268
Acinetobacter sp. HPC1269
Acinetobacter sp. HPC1280
Acinetobacter sp. HPC1322
Acinetobacter sp. HPC1324
Acinetobacter sp. HPC1325
Acinetobacter sp. HPC1326
Acinetobacter sp. HPC1327
Acinetobacter sp. HPC1331
Acinetobacter sp. HPC1335
Acinetobacter sp. HPC1339
Acinetobacter sp. HPC1348
Acinetobacter sp. HPC141
Acinetobacter sp. HPC151
Acinetobacter sp. HPC159
Acinetobacter sp. HPC235
Acinetobacter sp. HPC270
Acinetobacter sp. HPC276
Acinetobacter sp. HPC277
Acinetobacter sp. HPC283
Acinetobacter sp. HPC304
Acinetobacter sp. HPC307
Acinetobacter sp. HPC308
Acinetobacter sp. HPC311
Acinetobacter sp. HPC39
Acinetobacter sp. HPC394
Acinetobacter sp. HPC397
Acinetobacter sp. HPC398
Acinetobacter sp. HPC399
Acinetobacter sp. HPC497
Acinetobacter sp. HPC498
Acinetobacter sp. HPC503

Acinetobacter sp. HPC62
Acinetobacter sp. HPC968
Acinetobacter sp. HPC979
Acinetobacter sp. HPW1
Acinetobacter sp. HS-A32
Acinetobacter sp. HSW-1a
Acinetobacter sp. HSW-1b
Acinetobacter sp. HTYC28
Acinetobacter sp. HX-2006
Acinetobacter sp. HY-7
Acinetobacter sp. HZBN4
Acinetobacter sp. Ic2
Acinetobacter sp. ICB-117
Acinetobacter sp. ICB117
Acinetobacter sp. ICS20401
Acinetobacter sp. IGCAR-9/07
Acinetobacter sp. II-7
Acinetobacter sp. II Gauze A 2 4
Acinetobacter sp. IK1_03
Acinetobacter sp. IK1_11
Acinetobacter sp. IK1_12
Acinetobacter sp. IK1_15
Acinetobacter sp. IK1_18
Acinetobacter sp. IK1_21
Acinetobacter sp. IK1_24
Acinetobacter sp. IK1_53
Acinetobacter sp. IK2_32
Acinetobacter sp. IK2_68
Acinetobacter sp. INT-01
Acinetobacter sp. IPB4
Acinetobacter sp. IPPW-10
Acinetobacter sp. IPPW-11
Acinetobacter sp. IPPW-12
Acinetobacter sp. IPPW-13
Acinetobacter sp. IPPW-14
Acinetobacter sp. IPPW-16
Acinetobacter sp. IPPW-19
Acinetobacter sp. IPPW-20
Acinetobacter sp. IPPW-23
Acinetobacter sp. IPPW-24
Acinetobacter sp. IPPW-6
Acinetobacter sp. IrT-R5M2-138
Acinetobacter sp. IrT-R5M2-7
Acinetobacter sp. IST 103
Acinetobacter sp. ISTPCP-3
Acinetobacter sp. J16
Acinetobacter sp. J3-A109
Acinetobacter sp. J332
Acinetobacter sp. J42
Acinetobacter sp. J6
Acinetobacter sp. JA02-2
Acinetobacter sp. JA03-2
Acinetobacter sp. JA04
Acinetobacter sp. JA04-2

Acinetobacter sp. JA05-2
Acinetobacter sp. JA08-2
Acinetobacter sp. JA09-2
Acinetobacter sp. JA10-2
Acinetobacter sp. JA11-2
Acinetobacter sp. JA12-2
Acinetobacter sp. JA13-2
Acinetobacter sp. JA14-2
Acinetobacter sp. JA15-2
Acinetobacter sp. JA17-2
Acinetobacter sp. JA19-2
Acinetobacter sp. JA20-2
Acinetobacter sp. JA21-2
Acinetobacter sp. JA22-2
Acinetobacter sp. JA23-2
Acinetobacter sp. JA25-2
Acinetobacter sp. JA26-2
Acinetobacter sp. JA27-2
Acinetobacter sp. JA28-2
Acinetobacter sp. JA29-2
Acinetobacter sp. JA30-2
Acinetobacter sp. JA35-2
Acinetobacter sp. JA36-2
Acinetobacter sp. JA37-2
Acinetobacter sp. JA38-2
Acinetobacter sp. JA40-2
Acinetobacter sp. JA42-2
Acinetobacter sp. JA49+2
Acinetobacter sp. JA52-2
Acinetobacter sp. JA63-2
Acinetobacter sp. JA64-2
Acinetobacter sp. JA65-2
Acinetobacter sp. JA68-2
Acinetobacter sp. JA69-2
Acinetobacter sp. JA70-2
Acinetobacter sp. JAM-GA0301
Acinetobacter sp. JAM-GA0701
Acinetobacter sp. JB10
Acinetobacter sp. JB11
Acinetobacter sp. JB15
Acinetobacter sp. JB17
Acinetobacter sp. JB19
Acinetobacter sp. JB29
Acinetobacter sp. JB3
Acinetobacter sp. JB37
Acinetobacter sp. JB41
Acinetobacter sp. JB5
Acinetobacter sp. JB54
Acinetobacter sp. JB7
Acinetobacter sp. JB9
Acinetobacter sp. JN18_V5_C
Acinetobacter sp. JN18_V65_E
Acinetobacter sp. JPB-1.07
Acinetobacter sp. KC024

Acinetobacter sp. KL-9
Acinetobacter sp. KNF2022
Acinetobacter sp. KS2
Acinetobacter sp. KSL5401-024
Acinetobacter sp. KSL5401-037
Acinetobacter sp. L
Acinetobacter sp. L03
Acinetobacter sp. L1
Acinetobacter sp. L32
Acinetobacter sp. LBEF
Acinetobacter sp. lbrf-2
Acinetobacter sp. LBV326
Acinetobacter sp. LCE1
Acinetobacter sp. LCE2
Acinetobacter sp. LE/72
Acinetobacter sp. LF-3
Acinetobacter sp. LGA41
Acinetobacter sp. LGB22
Acinetobacter sp. LGB4
Acinetobacter sp. Lhl-4r
Acinetobacter sp. LM0105
Acinetobacter sp. LM0205
Acinetobacter sp. LM1
Acinetobacter sp. LM2
Acinetobacter sp. LM2305
Acinetobacter sp. LMG M71
Acinetobacter sp. LMG TH120
Acinetobacter sp. LMG V68
Acinetobacter sp. LMG V90
Acinetobacter sp. Lo24
Acinetobacter sp. LOB-6
Acinetobacter sp. LR20
Acinetobacter sp. LR30
Acinetobacter sp. LR32
Acinetobacter sp. LS56-7
Acinetobacter sp. LUH 1469
Acinetobacter sp. LUH 1472
Acinetobacter sp. LUH1090
Acinetobacter sp. LUH1470
Acinetobacter sp. LUH3790
Acinetobacter sp. LUH4547
Acinetobacter sp. LUH4555
Acinetobacter sp. LUH5605
Acinetobacter sp. LZXC01
Acinetobacter sp. LZXC18
Acinetobacter sp. LZXC2
Acinetobacter sp. LZXC8
Acinetobacter sp. M-1
Acinetobacter sp. M071019V-1
Acinetobacter sp. M114
Acinetobacter sp. M145
Acinetobacter sp. M2L2
Acinetobacter sp. M4
Acinetobacter sp. M438

Acinetobacter sp. M444
Acinetobacter sp. M522
Acinetobacter sp. M526
Acinetobacter sp. M9
Acinetobacter sp. mA3
Acinetobacter sp. MBDD-4
Acinetobacter sp. MG80
Acinetobacter sp. MH-140
Acinetobacter sp. MH-159
Acinetobacter sp. MH03
Acinetobacter sp. MH04
Acinetobacter sp. MH27
Acinetobacter sp. MH38
Acinetobacter sp. MH40
Acinetobacter sp. Mhg 4
Acinetobacter sp. MK28
Acinetobacter sp. MK2S9
Acinetobacter sp. ML11
Acinetobacter sp. ML12
Acinetobacter sp. ML13
Acinetobacter sp. ML21
Acinetobacter sp. MN12
Acinetobacter sp. MN33
Acinetobacter sp. MN37
Acinetobacter sp. MO
Acinetobacter sp. MOLA 17
Acinetobacter sp. MOLA 336
Acinetobacter sp. MT28
Acinetobacter sp. MUB1
Acinetobacter sp. Muzt-B21
Acinetobacter sp. Muzt-B31
Acinetobacter sp. Muzt-D95
Acinetobacter sp. Muzt-E02
Acinetobacter sp. Muzt-E61
Acinetobacter sp. Muzt-E91
Acinetobacter sp. Muzt-F02
Acinetobacter sp. Muzt-G31
Acinetobacter sp. Muzt-G51
Acinetobacter sp. Muzt-J21
Acinetobacter sp. N1
Acinetobacter sp. N1(2008)
Acinetobacter sp. N12
Acinetobacter sp. N15
Acinetobacter sp. N2
Acinetobacter sp. N40
Acinetobacter sp. NB4
Acinetobacter sp. NCIMB9871
Acinetobacter sp. NF4
Acinetobacter sp. NH88-11
Acinetobacter sp. Ni38
Acinetobacter sp. NII-60
Acinetobacter sp. NIOB 016
Acinetobacter sp. NIPH 817
Acinetobacter sp. NIPH 973

Acinetobacter sp. NJ-41
Acinetobacter sp. NJUST01
Acinetobacter sp. no. 6
Acinetobacter sp. NP143b
Acinetobacter sp. NX2
Acinetobacter sp. OC4
Acinetobacter sp. OK1
Acinetobacter sp. OM-E81
Acinetobacter sp. OPB5
Acinetobacter sp. OTUC6
Acinetobacter sp. OVT1-RT-4
Acinetobacter sp. P
Acinetobacter sp. P-106
Acinetobacter sp. P-107
Acinetobacter sp. P-108
Acinetobacter sp. P-109
Acinetobacter sp. P-110
Acinetobacter sp. P-112
Acinetobacter sp. P-116
Acinetobacter sp. P-121
Acinetobacter sp. P-126
Acinetobacter sp. P-128
Acinetobacter sp. P-133
Acinetobacter sp. P-134
Acinetobacter sp. P-140
Acinetobacter sp. P-141
Acinetobacter sp. P-142
Acinetobacter sp. P-143
Acinetobacter sp. P-146
Acinetobacter sp. P-148
Acinetobacter sp. P-153
Acinetobacter sp. P-155
Acinetobacter sp. P-156
Acinetobacter sp. P-157
Acinetobacter sp. P-158
Acinetobacter sp. P11-B-4
Acinetobacter sp. p13F2
Acinetobacter sp. P1L001
Acinetobacter sp. P2-2
Acinetobacter sp. P507
Acinetobacter sp. PAH-4
Acinetobacter sp. PALXIL10
Acinetobacter sp. PAMU-1.11
Acinetobacter sp. PB20
Acinetobacter sp. PB32
Acinetobacter sp. PC IW 04
Acinetobacter sp. PC11
Acinetobacter sp. PC19
Acinetobacter sp. PD12
Acinetobacter sp. PD4
Acinetobacter sp. PD5
Acinetobacter sp. PF11
Acinetobacter sp. PG1.2
Acinetobacter sp. PG7

Acinetobacter sp. PGO13
Acinetobacter sp. PGO14
Acinetobacter sp. PGO15
Acinetobacter sp. PGS49
Acinetobacter sp. PHA-P3
Acinetobacter sp. phc1
Acinetobacter sp. PHD-4
Acinetobacter sp. phenon 10
Acinetobacter sp. phenon 11
Acinetobacter sp. phenon 8
Acinetobacter sp. phenon 9
Acinetobacter sp. Pi 4
Acinetobacter sp. PIC-C23
Acinetobacter sp. pij-1
Acinetobacter sp. PL1.2
Acinetobacter sp. PL4
Acinetobacter sp. PmeaMuc16
Acinetobacter sp. PN14
Acinetobacter sp. PN32
Acinetobacter sp. PND-4
Acinetobacter sp. PND-5
Acinetobacter sp. PP-1
Acinetobacter sp. PP1
Acinetobacter sp. PPT1
Acinetobacter sp. PRGB15
Acinetobacter sp. PRGB16
Acinetobacter sp. PSGB03
Acinetobacter sp. PSGB04
Acinetobacter sp. PSGB05
Acinetobacter sp. Q
Acinetobacter sp. QN6
Acinetobacter sp. R-25580
Acinetobacter sp. R3
Acinetobacter sp. R32
Acinetobacter sp. RA3849
Acinetobacter sp. RAG-1
Acinetobacter sp. Raminalimon
Acinetobacter sp. RBE2CD-101
Acinetobacter sp. RBE2CD-114
Acinetobacter sp. RBE2CD-28
Acinetobacter sp. RBE2CD-31
Acinetobacter sp. RBE2CD-76
Acinetobacter sp. RD4355
Acinetobacter sp. RM160
Acinetobacter sp. RN3
Acinetobacter sp. RSC
Acinetobacter sp. RUH 2218
Acinetobacter sp. RUH 2866
Acinetobacter sp. RUH1139
Acinetobacter sp. RUH53T
Acinetobacter sp. S2
Acinetobacter sp. S2(2005)
Acinetobacter sp. S274
Acinetobacter sp. S275

Acinetobacter sp. S3-25
Acinetobacter sp. S429_17
Acinetobacter sp. S429_2
Acinetobacter sp. SA1
Acinetobacter sp. SA4
Acinetobacter sp. SAL_13
Acinetobacter sp. SAP6
Acinetobacter sp. SB180
Acinetobacter sp. SB22
Acinetobacter sp. SBSN
Acinetobacter sp. SDDC12
Acinetobacter sp. SDT-2005
Acinetobacter sp. SE0105
Acinetobacter sp. SE0205
Acinetobacter sp. SE0805
Acinetobacter sp. SE19
Acinetobacter sp. Sea-12
Acinetobacter sp. Sea-9
Acinetobacter sp. SeaH-As2w
Acinetobacter sp. secA
Acinetobacter sp. secN
Acinetobacter sp. SENDO1
Acinetobacter sp. SF2
Acinetobacter sp. SF4
Acinetobacter sp. SF6
Acinetobacter sp. SF18
Acinetobacter sp. SF19
Acinetobacter sp. SG1
Acinetobacter sp. SH-8
Acinetobacter sp. SH825131.2
Acinetobacter sp. SK2
Acinetobacter sp. SL-3
Acinetobacter sp. SL-SNB
Acinetobacter sp. SLH4
Acinetobacter sp. SMCC B0208
Acinetobacter sp. SMCC G917
Acinetobacter sp. SMT-4
Acinetobacter sp. SO-A5-1
Acinetobacter sp. SO-A5-105
Acinetobacter sp. SO-A5-61
Acinetobacter sp. SO65Braf
Acinetobacter sp. SR-C
Acinetobacter sp. SR1-5a
Acinetobacter sp. SR3
Acinetobacter sp. SRR-55
Acinetobacter sp. SS-2
Acinetobacter sp. ST-01
Acinetobacter sp. ST-550
Acinetobacter sp. ST-FER-2
Acinetobacter sp. st25
Acinetobacter sp. SUN
Acinetobacter sp. SUN-72
Acinetobacter sp. SVUB2
Acinetobacter sp. SWJ11

Acinetobacter sp. SY-01
Acinetobacter sp. SY23
Acinetobacter sp. SY35
Acinetobacter sp. SY75
Acinetobacter sp. SY76
Acinetobacter sp. SYSN-1-1
Acinetobacter sp. SYSN1
Acinetobacter sp. T133
Acinetobacter sp. T2
Acinetobacter sp. T4
Acinetobacter sp. T45
Acinetobacter sp. TB40
Acinetobacter sp. TB41
Acinetobacter sp. TB42
Acinetobacter sp. TB47
Acinetobacter sp. TB52
Acinetobacter sp. TC19
Acinetobacter sp. TC21
Acinetobacter sp. TC7
Acinetobacter sp. TCCC11051
Acinetobacter sp. TD IW 08
Acinetobacter sp. TD5
Acinetobacter sp. TDIW10
Acinetobacter sp. TDIW13
Acinetobacter sp. TDIW17
Acinetobacter sp. TDWCW6
Acinetobacter sp. TM1_6
Acinetobacter sp. TM6_6
Acinetobacter sp. Tpl-26
Acinetobacter sp. TPR15
Acinetobacter sp. TS IW 07
Acinetobacter sp. TS10
Acinetobacter sp. TS11
Acinetobacter sp. TS14
Acinetobacter sp. TS25
Acinetobacter sp. TS39
Acinetobacter sp. TS42
Acinetobacter sp. TS6
Acinetobacter sp. TSIW11
Acinetobacter sp. TSIW21
Acinetobacter sp. TSIW29
Acinetobacter sp. TSIW30
Acinetobacter sp. TSIW37
Acinetobacter sp. TUT1001
Acinetobacter sp. U11
Acinetobacter sp. u21
Acinetobacter sp. U51-2
Acinetobacter sp. Ud-4
Acinetobacter sp. ULV10
Acinetobacter sp. ULV16
Acinetobacter sp. ULV2
Acinetobacter sp. ULV4
Acinetobacter sp. ULV8
Acinetobacter sp. ULV9

Acinetobacter sp. UMB 11
Acinetobacter sp. UMB 32
Acinetobacter sp. UMB 33p
Acinetobacter sp. UMB 40
Acinetobacter sp. UMB79
Acinetobacter sp. URAM1
Acinetobacter sp. V-26
Acinetobacter sp. V4.BE.09
Acinetobacter sp. V4.BS.03
Acinetobacter sp. V4.ME.25
Acinetobacter sp. V4.MO.29
Acinetobacter sp. VB31
Acinetobacter sp. Ver3
Acinetobacter sp. Ver5
Acinetobacter sp. Ver7
Acinetobacter sp. VKM05
Acinetobacter sp. VKPM14
Acinetobacter sp. VKPM45
Acinetobacter sp. VTT E-072658
Acinetobacter sp. VTT E-073065
Acinetobacter sp. W-17
Acinetobacter sp. w1
Acinetobacter sp. W186-3
Acinetobacter sp. w2
Acinetobacter sp. W22
Acinetobacter sp. WAB1867
Acinetobacter sp. WAB1899
Acinetobacter sp. WAB1900
Acinetobacter sp. WAB1910
Acinetobacter sp. WAB1931
Acinetobacter sp. WAB1934
Acinetobacter sp. WAB1941
Acinetobacter sp. WAB1950
Acinetobacter sp. WMF-4
Acinetobacter sp. WMF-9
Acinetobacter sp. WO2008034648_27348
Acinetobacter sp. wpo2421
Acinetobacter sp. WSL-3
Acinetobacter sp. WSL-4
Acinetobacter sp. WSL-9
Acinetobacter sp. Wuba16
Acinetobacter sp. Wuba25
Acinetobacter sp. Wuba39
Acinetobacter sp. WW21
Acinetobacter sp. X1
Acinetobacter sp. XA05
Acinetobacter sp. XH7
Acinetobacter sp. Y3A
Acinetobacter sp. Y8
Acinetobacter sp. YAA
Acinetobacter sp. YSNZ
Acinetobacter sp. YT-b3
Acinetobacter sp. YY-5
Acinetobacter sp. Z21

Acinetobacter sp. zf-104-II

Acinetobacter sp. zf-78-II

Acinetobacter sp. zf-IIRht10

Acinetobacter sp. zf-IIRht17

Acinetobacter sp. zf-IRht15

Acinetobacter sp. ZHT42

Acinetobacter sp. ZY022

unclassified Acinetobacter

Arctic sea ice bacterium ARK10033

rainbow trout intestinal bacterium A75

environmental samples

Acinetobacter sp. enrichment culture clone LYC-1

Acinetobacter sp. enrichment culture clone YFZ2

uncultured Acinetobacter AC1

uncultured Acinetobacter AC2

uncultured Acinetobacter clone MT6

uncultured Acinetobacter NB1

uncultured Acinetobacter NB2

uncultured Acinetobacter sp.

uncultured Acinetobacter sp. FR004

uncultured Acinetobacter sp. FR009

uncultured Acinetobacter sp. FR011

uncultured Acinetobacter sp. FR017

uncultured Acinetobacter sp. FR027

uncultured Acinetobacter sp. FR038

uncultured Acinetobacter sp. HD-2000/18

uncultured bacterium O11F12

uncultured bacterium O11G12

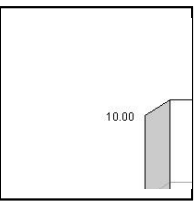
uncultured bacterium O14G3

uncultured bacterium O18A5

uncultured gamma proteobacterium GR-B1-2-37

Anexo II. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos pela técnica de disco difusão das amostras de *Acinetobacter* spp. de acordo com as recomendações do CLSI (2006a).

Número da Amostra	Halo em mm							
	CAZ ^a	CPM ^a	IMP ^a	MER ^a	ATM ^a	CIP ^a	SAM ^a	TIM ^a
1077	19	16	18	17	14	21	19	6
1029	21	26	33	26	16	30	30	23
1069	21	23	11	16	14	21	18	6
1039	24	25	30	26	23	24	31	25
17039	26	28	35	26	14	29	NT	26
17042	27	31	32	32	23	35	38	29
30009	18	16	31	25	16	6	NT	25
30064	21	26	32	27	19	6	26	25
30054	22	23	30	20	19	26	27	24
30086	24	27	30	28	20	31	29	27
30069	25	25	32	25	14	28	30	26
30060	26	28	31	27	25	29	35	37
30021	27	30	30	32	25	30	NT	17
30032	34	34	32	33	36	32	NT	27
38034	18	22	29	24	22	6	24	24
38094	18	17	26	18	9	24	22	22
38020	19	24	30	24	13	28	24	24
38012	20	22	28	22	14	22	22	24
38095	20	22	32	22	18	26	24	26
38004	22	24	30	24	14	30	28	28
38035	22	24	27	25	16	26	24	24
38099	22	22	27	24	12	24	26	25
38022	24	28	30	27	19	32	28	25
58022	18	18	30	24	12	6	20	20
58040	22	24	32	29	18	30	30	29
58088	24	25	30	24	16	18	28	27
70054	22	24	30	24	14	28	24	22



70090	22	20	30	22	15	6	25	24
70083	24	24	36	30	18	28	29	25
17069	20	23	28	27	16	22	27	21
17071	21	23	28	24	17	28	27	23
17086	21	24	29	24	16	28	29	24
17066	26	26	32	30	21	31	34	31
17068	27	30	42	40	22	35	40	34
17043	30	34	41	39	25	40	40	39
30053	20	28	33	26	27	30	31	27
30078	21	25	28	25	18	26	6	18
30063	24	27	35	31	28	28	33	30
30083	24	28	34	30	18	28	31	24
30035	25	28	40	31	24	30	29	32
30062	27	28	34	28	25	28	NT	27
30076	33	38	40	35	30	35	NT	37
58054	27	29	30	28	25	30	NT	26
58010	32	33	30	29	40	32	13	26
146055	22	26	30	26	23	23	29	NT^b
146054	23	25	32	27	24	26	35	NT^b
146048	25	27	30	28	23	30	32	NT^b
146097	25	29	30	30	24	30	34	NT^b
146098	25	25	32	28	22	28	30	NT^b

a. CAZ, ceftazidima; CPM, cefepima; IMP, imipenem; MER, meropenem; ATM, aztreonam; CIP, ciprofloxacina; SAM, ampicilina/sulbactam; TIM, ticarcilina/ácido clavulânico.

b. NT, Não testado