

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DE ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS E SUA ASSOCIAÇÃO
COM A RESISTÊNCIA EM *ACINETOBACTER BAUMANNII*

MARIANA PAGANO

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DE ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS E SUA ASSOCIAÇÃO
COM A RESISTÊNCIA EM *ACINETOBACTER BAUMANNII*

MARIANA PAGANO

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas,
UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Mestre

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Pagano, Mariana

Avaliação de elementos genéticos móveis e sua associação com a resistência em *Acinetobacter baumannii* / Mariana Pagano. -- 2012.
84 f.

Orientador: Afonso Luís Barth.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Resistência aos carbapenêmicos. 3. ISAbal. 4. Integrons. I. Barth, Afonso Luís, orient. II. Título.

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

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
A quem dedico esta conquista.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Afonso Barth pela confiança, paciência e exemplo de profissionalismo e ética.

À minha querida professora Andreza Martins, pela amizade, dedicação e oportunidades à mim oferecidas.

Aos meus queridos colegas e amigos da Unidade Microbiologia e Biologia Molecular.

À Alice pela amizade, estímulo, paciência e grande auxílio na discussão de técnicas e resultados.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, Franciéli, Juliana e Vanessa pelo incentivo, apoio e por compartilhar comigo expectativas e angústias.

Ao Everaldo do Centro de Pesquisa Experimental por toda presteza durante a execução deste trabalho.

Às colegas do ICBS, Carolina Gusatti e Letícia Otton pela concessão de controles positivos, além da disposição de auxílio durante a realização do trabalho.

Ao meu amigo e colega, Diego Baronio pelo constante incentivo e apoio.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um dos principais patógenos associados a infecções nosocomiais, incluindo pneumonias, meningites secundárias, infecções urinárias e bacteremias. Esse microrganismo apresenta uma grande capacidade de se disseminar, além de adquirir novos mecanismos de resistência. Devido a essas propriedades, numerosos surtos de *Acinetobacter baumannii* multirresistente têm sido relatados em diversos países, inclusive no Brasil. O objetivo deste estudo foi analisar mecanismos envolvidos na resistência em *Acinetobacter baumannii*, avaliando a relação de elementos promotores com o aumento da resistência aos carbapenêmicos, além de analisar a presença de integrons envolvidos na disseminação de genes de resistência. Este foi um estudo transversal experimental no qual foram incluídas amostras provenientes de cinco hospitais da cidade de Porto Alegre obtidas no período de julho de 2007 a junho de 2008. Foram selecionados 41 isolados resistentes aos carbapenêmicos representantes de diferentes clones determinados por *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) além de 17 amostras sensíveis aos carbapenêmicos, totalizando 58 isolados no estudo. Todos os isolados analisados apresentaram o gene *bla*_{OXA-51-like}, caracterizando a espécie *A. baumannii*. Integrons de classe 2 foram os mais prevalentes (50; 86.2%) nos isolados testados, entretanto, integrons de classe 1 (15; 25.9%) também foram detectados. O elemento de inserção *ISAbal1* foi evidenciado em associação com o gene *bla*_{OXA-23-like} em 36 isolados resistentes, e demonstrou uma significativa relação ($p < 0,001$) com o aumento das concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos carbapenêmicos imipenem e meropenem. A associação de *ISAbal1* com *bla*_{OXA-51-like} não apresentou relação com aumento das MICs para os carbapenêmicos. A partir dos dados mostrados nesse trabalho, demonstramos a importância do elemento *ISAbal1*, quando associado ao gene *bla*_{OXA-23-like}, no aumento dos níveis de resistência aos carbapenêmicos meropenem e imipenem. A presença de integrons em todos os isolados resistentes aos carbapenêmicos reitera a importância desses elementos na disseminação de determinantes da resistência entre isolados de *A. baumannii*.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*, resistência, elementos genéticos móveis

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mecanismos de resistência para diferentes classes de antimicrobianos em <i>A. baumannii</i>	78
Tabela 2. β -lactamases identificadas em <i>A. baumannii</i>	80
Tabela 3. Genes de resistência identificados em cassetes gênicos.....	81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática de Tn2007, Tn2006 e Tn2008.....83
- Figura 2. Representação simplificada de um integron de classe 1.....84

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC- *Acinetobacter derived cephalosporinase*

ATCC- *American Type Culture Collection*

BSAC- *British Society for Antimicrobial Chemotherapy*

CHDL- *Carbapenem-hydrolyzing class D enzymes* (enzimas de classe D que hidrolizam carbapenêmicos)

CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*

ESBL- *Extended-spectrum beta-lactamase* (beta-lactamase de espectro estendido)

IS- Sequência de inserção

KPC- *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MBL- Metalo-beta-lactamase

MDR- *Multi-drug resistant* (multirresistente)

MIC- *Minimal Inhibitory Concentration* (Concentração Inibitória Mínima)

ORF- *Open reading frame* (sequência aberta de leitura)

OXA- Oxacilinase

PBP- *Penicillin binding protein* (Proteína ligadora de penicilina)

PFGE- *Pulsed field gel eletrophoresis*

UTI- Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
SUMÁRIO	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Características do Gênero	15
2.2 Taxonomia	15
2.3 Infecções causadas por <i>A. baumannii</i>	17
2.4 Tratamento das infecções causadas por <i>A. baumannii</i>	18
2.5 Mecanismos de Resistência	19
2.6 Resistência aos carbapenêmicos em <i>A. baumannii</i>	23
2.6 Resistência aos carbapenêmicos em <i>A. baumannii</i>	23
2.6.1 β -lactamases	24
2.6.2 Oxacilinases	26
2.6.3 Metallo- β -lactamases.....	29
2.7 Elementos Genéticos Móveis.....	30
2.7.1 Elementos transponíveis.....	30
2.7.2 Sequências de Inserção (IS).....	33
2.7.3 Integrons.....	35
2.7.4 Cassetes Gênicos.....	39
OBJETIVOS.....	41
Objetivo Geral:	41
Objetivos específicos:	41
REFERÊNCIAS.....	42

ARTIGO	61
CONSIDERAÇÕES GERAIS	77
TABELAS	79
FIGURAS	84

1. INTRODUÇÃO

Desde a década de 70, bactérias do gênero *Acinetobacter* têm sido amplamente reconhecidas como importantes patógenos envolvidos em infecções nosocomiais incluindo bacteremias, infecções do trato urinário, pneumonias e meningites, contudo, seu principal papel está relacionado à pneumonia nosocomial, particularmente pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI). Essas infecções são de difícil tratamento devido à resistência dessas bactérias a um grande grupo de antimicrobianos [1,2].

Trinta e duas espécies de *Acinetobacter* já foram reconhecidas e descritas. Entre as diferentes espécies, *Acinetobacter baumannii* é considerada a de maior importância clínica. Diversos estudos indicam que esta é a principal espécie relacionada a surtos de infecção hospitalar, inclusive apresentando perfis de multirresistência e até mesmo pan resistência em alguns locais [3].

Acinetobacter baumannii encontra-se amplamente distribuído no ambiente hospitalar, possuindo características únicas entre as bactérias gram-negativas que favorecem sua persistência nesse ambiente. Esse microrganismo encontra-se distribuído na natureza, principalmente na água e no solo, necessitando de condições simples para seu crescimento, já que utiliza uma larga variedade de substratos como fontes de carbono. Esta versatilidade nutricional, facilita a adaptação destas bactérias ao meio ambiente, podendo ser isoladas até mesmo em geleiras [4,5].

Fatores de risco que predispõem a infecções causadas por *A. baumannii* incluem hospitalização por períodos prolongados, cirurgias, procedimentos invasivos como catéteres ou ventilação mecânica, falha cardiovascular ou respiratória, permanência em UTIs e terapias antimicrobianas prévias [2,3].

Até o início dos anos 70, infecções nosocomiais por *A. baumannii* eram tratadas com sucesso com gentamicina, minociclina, ácido nalidíxico, ampicilina, ou carbenicilina, tanto sozinhos quanto combinados, entretanto,

taxas de resistência em elevação começaram a ser divulgadas entre 1971 e 1974 [6]. Desde a década de 90 tem sido documentado um aumento na incidência de isolados resistentes aos carbapenêmicos. Desde então, a resistência ao imipenem tem-se elevado drasticamente, tornando-se um evento global [7]. A resistência aos carbapenêmicos tem sido associada principalmente à produção de oxacilinases (OXAs) e menos frequentemente, metalo- β -lactamases (M β Ls) [8].

A presença do elemento de inserção *ISAba1* localizado *upstream* a genes de resistência como *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{AmpC} tem sido associado a um aumento na resistência aos carbapenêmicos [9,10]. Além disso, *ISAba1* possui a capacidade de mobilizar genes como *bla*_{OXA-23-like}, tornando a disseminação desses genes cada vez mais facilitada por esses elementos genéticos móveis [11].

Outra causa importante do aumento da resistência em isolados de *A. baumannii* é a presença de integrons contendo cassetes gênicos [12]. Mais de 130 diferentes cassetes contendo genes de resistência já foram identificados em integrons. Os genes contidos nesses cassetes são capazes de contribuir para a resistência à maioria das classes de antimicrobianos incluindo β -lactâmicos, todos os aminoglicosídeos, cloranfenicol, trimetoprim, estreptomicina, rifampicina, eritromicina, fosfomicina, lincomicina e quinolonas [13,14].

A grande diversidade de eventos genéticos envolvidos na resistência de *A. baumannii* aos antimicrobianos vem despertando a necessidade de estudos a respeito desses determinantes da resistência. Com isso, o estudo de determinantes da resistência a antimicrobianos, além da avaliação da sua prevalência e disseminação em isolados de *A. baumannii* se torna de grande importância para o melhor entendimento da epidemiologia local desses mecanismos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do Gênero

Acinetobacter spp. são microrganismos de vida livre presentes no ambiente (água, solo e alimentos). O gênero está classificado dentro da família Moraxellaceae e compreende cocobacilos gram-negativos, estritamente aeróbios, imóveis, oxidase negativa, catalase positiva e com conteúdo de G+C de 39% a 47% [1,2]. Esses microrganismos crescem em ágar sangue formando colônias branco-acinzentadas e em ágar MacConkey com colônias levemente rosadas normalmente cremosas, que podem eventualmente ter aspecto mucóide [1]. A temperatura ótima de crescimento é de 34-35°C, entretanto alguns isolados da água são psicotróficos, podendo crescer em temperaturas de 4-30°C [15].

2.2 Taxonomia

A história do gênero *Acinetobacter* inicia-se em 1911 quando Beijerinck, um microbiologista holandês descreveu um microrganismo isolado do solo, denominado *Micrococcus calcoaceticus*. Com o passar das décadas, microrganismos similares foram descritos e denominados com pelo menos 15 diferentes gêneros e espécies, incluindo *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium anitratum*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter mucosus* entre outros [15].

A designação *Acinetobacter* (akinetos, do grego, não móvel) foi inicialmente proposta por Brisou & Prévot, em 1954, com objetivo de separar os microrganismos móveis dos não móveis [1]. Baseado em dados taxonômicos mais recentes, foi proposto que membros do gênero *Acinetobacter* deveriam

ser classificados na nova família Moraxellaceae, da ordem Gammaproteobacteria, que inclui os gêneros: *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* e organismos relacionados [16].

Em 1986, Bouvet & Grimont publicaram uma classificação baseada em estudos de hibridização de DNA-DNA que possibilitaram distinguir 12 genomoespécies de *Acinetobacter*. Algumas destas, receberam nomes como *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* e *A. lwoffii* [1,17]. A partir desta classificação, Bouvet e Jeanjean, Tjernberg e Ursing e Nishimura e colaboradores realizaram estudos que levaram à identificação de novas genomoespécies, incluindo a espécie *A. radioresistens* que corresponde à antiga genomoespécie 12 descrita previamente por Bouvet & Grimont em 1986 [18-20].

Testes fenotípicos de identificação se mostraram muito úteis na identificação de muitas, mas não todas espécies de *Acinetobacter*. Em particular, espécies como *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* (anteriormente denominadas 3 e 13TU, respectivamente) não podem ser separadas por testes fenotípicos devido ao seu alto grau de similaridade [3,21]. A partir dessa dificuldade na distinção dessas espécies foi proposto agrupá-las em um complexo chamado *A. baumannii*- *A. calcoaceticus* [22] .

2.3 Infecções causadas por *A. baumannii*

A. baumannii é caracterizado como sendo um patógeno oportunista causador de infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos, com doenças graves, ou que estejam submetidos a procedimentos invasivos. Nos últimos anos, esse patógeno vem se tornando a maior causa de infecções nosocomiais associadas com uma significativa morbimortalidade [23,24].

As principais infecções associadas a esse patógeno são pneumonia associada a ventilação mecânica, infecções do trato urinário, meningites secundárias, endocardites, infecções na pele ou tecidos moles e bacteremias [1,2]. Os fatores de risco que predispõem indivíduos a desenvolver essas infecções incluem longa permanência no ambiente hospitalar, cirurgia prévia, traumas por queimaduras, utilização de catéteres ou tubos de drenagem, prévia terapia antimicrobiana e severidade da doença [2,3].

Embora o gênero *Acinetobacter* esteja diretamente relacionado a infecções hospitalares, os relatos de infecções adquiridas na comunidade vêm aumentando. *A. baumannii* vem sendo descrito, embora eventualmente, como um importante causador de pneumonia adquirida na comunidade [25]. A maioria desses relatos têm sido associados a condições como alcoolismo, tabagismo, doença pulmonar obstrutiva crônica e diabetes mellitus [3,25].

Infecções causadas por *Acinetobacter* spp. associadas a desastres naturais, como o terremoto ocorrido na Turquia em 1999, ou a guerras como a do Iraque e Vietnã também vêm sendo descritas [23,26]. Um grande número de infecções em feridas e queimaduras, além de casos de osteomielite causadas por *A. baumannii* multirresistente, foi descrito durante a guerra do Iraque [27,28]. Entretanto, os mecanismos exatos envolvidos no estabelecimento e progresso dessas infecções ainda não estão totalmente elucidados.

2.4 Tratamento das infecções causadas por *A. baumannii*

Os carbapênemicos (com exceção do ertapenem) são antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro e alta potência contra bacilos gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Burkholderia cepacia*. Atualmente são considerados a melhor opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* multirresistente [29,30]. O mecanismo de ação desses antimicrobianos consiste na inativação da síntese de parede celular pela ligação do antimicrobiano às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) na bactéria. Essa ligação irá interferir nas ligações cruzadas do peptidoglicano impedindo a transpeptidação final da parede celular bacteriana. Como consequência, a parede celular ficará desestabilizada, resultando na morte celular por ruptura devido à pressão osmótica [31].

Carbapenêmicos possuem ótima atividade bactericida e uma alta estabilidade frente à ação de β -lactamases. Entretanto, as taxas de suscetibilidade de *Acinetobacter* sp. aos carbapenêmicos podem variar consideravelmente (maiores que 90% até menores que 32%), dependendo da região geográfica avaliada. Em situações de resistência a esses antimicrobianos, as opções terapêuticas tornam-se bastante limitadas, sendo as mais estudadas tigeciclina e polimixinas [32].

Discordâncias entre as taxas de suscetibilidade de imipenem e meropenem têm sido descritas, portanto é importante que o resultado da suscetibilidade aos dois carbapenêmicos seja reportado ao médico. Essa discrepância corrobora a idéia que diferentes mecanismos estão envolvidos na resistência aos carbapenêmicos e que o perfil de suscetibilidade do imipenem não pode ser utilizado para prever suscetibilidade ao meropenem e vice-versa [33].

Programas de vigilância já documentaram que meropenem possui, de fato, uma menor atividade contra cepas multirresistentes de *A. baumannii* quando comparado ao imipenem na América do Norte e na Europa [34,35].

Esses resultados têm sido ratificados pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY em regiões geográficas distintas [36]. Embora estudos já confirmem uma melhor atividade do imipenem contra *A. baumannii* multirresistente, Ikonomidis e colaboradores, utilizando 320 isolados de *A. baumannii* de diversos hospitais da Grécia, observaram uma superioridade da atividade de meropenem comparada ao imipenem. Essa discrepância na atividade dos dois carbapenêmicos pode ser explicada por mecanismos de resistência distintos disseminados em cada localidade [33,36].

Doripenem é um novo carbapenêmico recém introduzido na Europa com significativa atividade *in vitro* em isolados de *A. baumannii*. Esse carbapenêmico possui um espectro de ação similar aos demais, entretanto a adição de um grupamento sulfamoil aminometil-pirrolidiniltiol contribui para uma melhor atividade antibacteriana. Além da adição desse grupamento, doripenem possui uma cadeia lateral 1- β -metil que permite uma estabilidade a dehidropeptidase I, dispensando a necessidade do uso da cilastatina. Esse antimicrobiano foi aprovado para uso em infecções no trato urinário e infecções intra-abdominais complicadas no Brasil [37].

Nordmann e colaboradores realizaram um estudo com objetivo de comparar a atividade de doripenem, meropenem e imipenem em infecções causadas por *Acinetobacter* sp. em pacientes hospitalizados na Europa, Oriente Médio e África. Os autores observaram que os três antimicrobianos demonstraram pouca atividade - aproximadamente 55% de suscetibilidade - sobre *Acinetobacter baumannii*. Entretanto, 14,9% dos isolados resistentes ao imipenem e meropenem se mostraram sensíveis ao doripenem [38].

2.5 Mecanismos de Resistência

Desde a última década, a contínua pressão seletiva exercida por diferentes antimicrobianos tem resultado em cepas portadoras de mecanismos de resistência adicionais – novas proteínas ligadoras de penicilina,

mecanismos enzimáticos, mutação de sítios alvo, aumento da expressão de bombas de efluxo e alteração na permeabilidade da membrana - que levam a uma diminuição da susceptibilidade ou, até mesmo, à resistência plena a múltiplos antimicrobianos [39].

Estudos demonstram que até a década de 70, as infecções causadas por *A. baumannii* eram tratadas com sucesso utilizando-se gentamicina, minociclina, ácido nalidíxico e ampicilina. Os primeiros relatos de resistência às penicilinas, cefalosporinas de primeira e de segunda geração, aminoglicosídeos, cloranfenicol e tetraciclinas foram documentados entre os anos de 1971 e 1974 [2].

A Sociedade de Doenças Infecciosas da América recentemente identificou *A. baumannii* como um dos seis patógenos particularmente problemáticos em termos de disponibilidade de antimicrobianos devido ao aumento de seus mecanismos de resistência [40]. Atualmente, surtos de *A. baumannii* apresentando fenótipos de multirresistência vêm sendo reportados em diversos hospitais na Europa, América do Norte, Argentina, Brasil, China, Taiwan, Hong Kong além de outras localidades [41-44].

Mecanismos de resistência aos antimicrobianos podem ser intrínsecos ou adquiridos, sendo ambos observados em *A. baumannii*. Mecanismos intrínsecos ocorrem a partir da expressão de genes encontrados no cromossomo bacteriano como, por exemplo, sistemas de efluxo, β -lactamases do tipo AmpC de bactérias gram-negativas e outras enzimas capazes de inativar antimicrobianos como aminoglicosídeos e quinolonas. Os mecanismos adquiridos envolvem mutações de genes alvo dos antimicrobianos e transferência de determinantes de resistência encontrados em plasmídios, transposons, bacteriófagos ou outros elementos genéticos móveis [45].

Essa resistência adquirida pode resultar da mutação de genes regulatórios ou estruturais, da aquisição de genes de resistência veiculados por elementos genéticos móveis ou da combinação de ambos os mecanismos [46]. A aquisição desses elementos tem sido relacionada com o desenvolvimento de multirresistência em *A. baumannii*. Isso se deve à propriedade desses

elementos de captar e disseminar genes de resistência como oxacilinases, metalo- β -lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, entre outros [47].

Diversos mecanismos estão envolvidos na resistência em *A. baumannii* (Tabela 1). Essa resistência ocorre principalmente devido a mecanismos enzimáticos, como a produção de β -lactamases, no entanto, existem outros mecanismos envolvidos como bombas de efluxo, perda de porinas e modificação de sítio alvo [3].

A multirresistência em *A. baumannii* tem sido relatada durante os últimos 15 anos, provavelmente como consequência do uso abusivo de agentes antimicrobianos [8]. Embora essa participação dos antimicrobianos na seleção de bactérias resistentes já esteja bem elucidada, a facilidade de disseminação de genes de resistência também tem sido fundamental para a rápida evolução da resistência a uma grande variedade de antimicrobianos não relacionados entre diversas bactérias. Esse fenômeno de resistência aos antimicrobianos é um excelente exemplo do impacto da transferência horizontal na adaptação das bactérias [48].

Muitos genes acessórios adquiridos por transferência horizontal formam as conhecidas ilhas genômicas. Essas ilhas causam um grande impacto na plasticidade e evolução bacteriana, na disseminação da resistência a alguns antimicrobianos e genes de virulência, e na formação de vias catabólicas em certas bactérias [49]. Análises de sequências do genoma de isolados de *A. baumannii* multirresistente revelaram a presença de diversas ilhas genômicas (AbaR1, R2, R3 e R5) contendo múltiplos genes de resistência que provavelmente foram adquiridos de outras bactérias gram-negativas [50].

A rápida disseminação global de *A. baumannii* resistentes a todos os β -lactâmicos, inclusive aos carbapenêmicos, demonstra o potencial desse microrganismo de responder à pressão seletiva ambiental. Essa elevada plasticidade genética favorece a captação de genes de reservatórios ambientais e, além disso, pode ocorrer a hiperexpressão de mecanismos intrínsecos como bombas de efluxo e uma baixa permeabilidade da membrana

externa. Esse aumento da resistência de *A. baumannii* aos antimicrobianos torna o tratamento empírico e as decisões terapêuticas cada vez mais difíceis [32].

2.6 Resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*

O uso crescente de carbapenêmicos no ambiente hospitalar é decorrente da maior prevalência de bacilos gram-negativos resistentes às cefalosporinas de espectro ampliado. O aumento do uso dos carbapenêmicos vem exercendo uma pressão seletiva sobre a microbiota hospitalar, o que pode estar ocasionando um aumento nos níveis de resistência de *A. baumannii* a esses antimicrobianos, além disso, um alto escore no APACHE II e malignidade também estão associados ao surgimento de isolados resistentes aos carbapenêmicos [8, 51].

A resistência aos carbapenêmicos foi descrita a partir da década de 1990 e desde 1997 cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos têm sido reportadas como endêmicas [52]. Até 2007, as taxas de susceptibilidade ao imipenem descritas na América Latina e Ásia eram muito menores quando comparadas à Europa e América do Norte [53].

Esta diminuição da suscetibilidade aos carbapenêmicos é conferida principalmente pela produção de *carbapenem-hydrolyzing class D enzymes* (CHDLs) e menos frequentemente, metalo- β -lactamases. No entanto, o aumento da resistência aos carbapenêmicos também pode estar relacionado a outros mecanismos como a redução da permeabilidade da membrana externa causada pela perda ou expressão reduzida de porinas, superexpressão de bombas de efluxo e, menos frequentemente, alteração nas PBPs [8,54].

2.6.1 β -lactamases

β -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico, tornando o antimicrobiano inativo e impedindo que ele apresente atividade sobre enzimas que atuam na síntese da parede celular bacteriana. Esse é o mais diverso grupo de enzimas associadas à resistência, e mais de cinquenta diferentes enzimas ou formas alélicas já foram identificadas em *A. baumannii* [3].

A classificação dessas enzimas está baseada na sua sequência de aminoácidos (classificação de Ambler) ou de acordo com sua função (classificação de Bush) [55]. Segundo a classificação de Ambler, as β -lactamases estão divididas em quatro classes (A, B, C e D), e ainda podem ser separadas em serina- β -lactamases (classes A, C e D) e metalo- β -lactamases (classe B). Entre as principais β -lactamases podemos citar AmpC, ESBL, e carbapenemases [56,57]. A tabela 2 mostra as principais β -lactamases envolvidas na resistência de *A. baumannii*.

A resistência mediada por β -lactamases é particularmente mais eficiente em bactérias gram-negativas. Esse fato se deve ao acúmulo dessas enzimas no espaço periplasmático, com a consequente inativação do β -lactâmico antes que esse se ligue às PBPs na membrana citoplasmática [58].

Desde a década de 1980, a classe A de enzimas emergiu e vem se disseminando rapidamente entre isolados clínicos da família Enterobacteriaceae. No entanto, desde 1990, casos de *A. baumannii* produtores de ESBL têm sido reportados mundialmente. As enzimas já relatadas em *A. baumannii* são TEM -1 e -2 [3], PER -1 e -2 [3,59], VEB -1, -1a e -3 [60,61], TEM -92 e -116[3], SHV -5 [62] e -12 [62,63], GES -11[64] e CTX-M-2 [65]. Em 2010, foi reportado pela primeira vez a produção de KPC por *A. baumannii* em Porto Rico [66].

A. baumannii possui AmpC de origem cromossomal, que, embora produzida em baixos níveis, possui atividade relacionada a fenótipos de

resistência intrínseca. Essa enzima é capaz de hidrolisar penicilinas e cefamicinas e, em baixos níveis, oxiaminocefalosporinas como ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona, e aztreonam. Em *A. baumannii* estas enzimas têm sido denominadas ADC (*Acinetobacter derived cephalosporinase*) [67].

Estudos prévios relacionaram a presença da sequência de inserção *ISAba1 upstream* ao gene *ampC*, com a hiperexpressão desse gene. Foi demonstrado que *ISAba1* fornece sequências promotoras que permitem um aumento na expressão de AmpC. Testes de indução de AmpC, utilizando imipenem ou cefoxitina como indutores e cefalotina como substrato, demonstraram que AmpC em *A. baumannii* não é induzível [68].

As β -lactamases da classe D (CHDLs) e B (metalo- β -lactamases) de Ambler são as principais enzimas envolvidas na resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos [8]. Cepas produtoras dessas carbapenemases têm sido associadas a surtos de infecção hospitalar, como também, a um aumento da mortalidade de pacientes infectados [8,69].

2.6.2 Oxacilinases

As oxacilinases (OXA) são enzimas pertencentes a classe D de Ambler e inseridas no grupo 2d na classificação de Bush [56]. Essas enzimas possuem uma serina em seu sítio ativo, localizada na posição 70 do sistema de numeração das enzimas de classe D. Oxacilinases usualmente não são inibidas por tazobactam, ácido clavulânico e sulbactam, no entanto sua atividade pode ser inibida por NaCl. NaCl na concentração de 100mM, é capaz de inibir completamente a atividade da maioria das enzimas da classe D. Essa propriedade não é compartilhada com β -lactamases de outras classes, podendo, portanto, ser uma característica útil para indentificação *in vitro* desta classe de enzimas [70].

As OXAs possuem a capacidade de hidrolisar oxacilina, amoxicilina, metilcilina, cefaloridina e cefalotina. A designação OXA das β -lactamases de classe D está associada com a capacidade de hidrolisar a oxacilina ou a cloxacilina como substratos preferenciais. Entretanto esta definição parece não ter mais valor, pois atualmente estes dois antimicrobianos sofrem fraca hidrólise por estas enzimas ou até mesmo, em algumas condições, não são hidrolisados [70].

Algumas β -lactamases da classe D possuem a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos, sendo chamadas de CHDLs (*Carbapenem-hydrolyzing class D enzymes*). No entanto, nenhuma dessas enzimas hidrolisa cefalosporinas de espectro estendido, indicando que as oxacilinases ainda não se mostram hábeis a combinar a capacidade de hidrólise de carbapenêmicos e cefalosporinas [8,71].

De acordo com Queenan & Bush, a capacidade de hidrólise dos carbapenêmicos pelas CHDLs é baixa devido ao baixo *turnover* dessas enzimas [55]. A capacidade dessas enzima de hidrolisar carbapenêmicos é de 100 a 1000 vezes menor quando comparada às M β Ls [8]. Deste modo, outros mecanismos de resistência (efluxo ou diminuição da permeabilidade) além de

elementos de inserção como IS*Aba1*, podem ser necessários para que as concentrações inibitórias mínimas (MICs) do imipenem e meropenem elevem-se acima dos pontos de corte de resistência estabelecidos [55,57].

As CHDLs estão divididas em cinco subgrupos filogenéticos de acordo com sua sequência de aminoácidos: *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-24/40-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143}. No Brasil, já foram relatados isolados de *A. baumannii* contendo *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-143} [72].

Todas as CHDLs em *A. baumannii* estão localizadas no cromossomo. No entanto, com exceção do gene *bla*_{OXA-51-like}, esses genes não são considerados ubiquitários ao genoma desta espécie. O conteúdo de G+C do gene *bla*_{OXA-51-like} varia de 39 a 40%, coincidindo com os valores encontrados em genes de *A. baumannii* [2]. O conteúdo de G+C do restante das oxacilinas varia de 34 a 38%, demonstrando que esses genes podem estar presentes em outras espécies [72].

O primeiro isolado de *A. baumannii* com serina-β-lactamase capaz de hidrolisar imipenem foi relatado em 1993 na Escócia e primeiramente denominado de ARI-1 (*Acinetobacter resistant imipenem*). O gene *bla*_{ARI-1} é composto por 882 pb e traduz uma proteína de 273 aminoácidos que demonstra uma sequência homóloga à das enzimas da classe D (grupo 2d). Assim, ARI-1 foi considerada uma β-lactamase de classe D e recebeu a denominação alternativa de OXA-23. Após essa descoberta, foram identificadas diversas variantes dessa família de enzima [73].

Estudo realizado por Poirel e colaboradores descreve a espécie *Acinetobacter radioresistens* como sendo o reservatório natural do gene *bla*_{OXA-23-like}, o qual pode ter sido transferido para *A. baumannii*. *A. radioresistens* é uma bactéria comensal, identificada na pele tanto de pacientes saudáveis quanto hospitalizados. Devido a essa característica, pode-se sugerir que a transmissão do gene *bla*_{OXA-23} de *A. radioresistens* para *A. baumannii* tenha ocorrido originalmente no ambiente hospitalar. Esta hipótese destaca o possível papel desse local como reservatório de genes de resistência, além de ambiente propício para a transmissão desses genes para outras bactérias [74].

A presença do gene *bla*_{OXA-23-like} em isolados de *A. baumannii* já foi observada tanto em DNA plasmidial quanto cromossomal associado a diversas estruturas gênicas como Tn2006, Tn2007, IS*Aba1*, e Tn2008. No transposon Tn2006, *bla*_{OXA-23} está flanqueada por duas cópias da sequência de inserção IS*Aba1*, localizadas em direções opostas. Tn2008 é muito similar ao Tn2006, no entanto contém apenas uma cópia da sequência IS*Aba1*, que no Tn2007 é substituída pela sequência de inserção IS*Aba4* adjacente ao gene da *bla*_{OXA-23-like} (Figura 1) [75].

O gene *bla*_{OXA-23-like} está unicamente relacionado à *A. baumannii*, com exceção de um único relato em *Proteus mirabilis* no ano de 2002 [57]. Desde sua descoberta, *bla*_{OXA-23-like} está sendo apontado como fonte de surtos de infecção nosocomial por diversos continentes, incluindo países como Brasil, Reino Unido, Coreia, Taiti, China, Iraque, Afeganistão, Bulgária e Polinésia Francesa [43,76-80].

Até recentemente, as CHDLs haviam sido reportadas apenas em *A. baumannii*, no entanto pesquisadores espanhóis identificaram a produção de OXA24/40-like em amostra clínica de *Pseudomonas aeruginosa*. Esse estudo evidenciou que *bla*_{OXA-24/40} estava inserido em um plasmídeo idêntico ao encontrado em *A. baumannii*, comprovando o potencial de disseminação interespécie desses determinantes da resistência [81]. O gene *bla*_{OXA-24-like} tem sido descrito desde 1996 na Península Ibérica, nos Estados Unidos, na China, na Coreia do Sul, em Taiwan e no Bahrein [82]. Em 2011 a variável *bla*_{OXA-72} foi descrita pela primeira vez no Brasil [83].

A ocorrência de *bla*_{OXA-58-like} em *Acinetobacter* spp. está disseminada mundialmente e fortemente associada à resistência aos carbapenêmicos, assim como à outros β -lactâmicos, fluorquinolonas e aminoglicosídeos. O primeiro relato de *A. baumannii* contendo *bla*_{OXA-58-like} ocorreu na França em 2003, e subsequente esta enzima foi identificada em amostras de surtos em um hospital francês, e em países do sul e leste europeu [84,85]. Figueiredo e colaboradores relataram o primeiro isolado de *A. baumannii* contendo *bla*_{OXA-58-like} na cidade do Rio de Janeiro, Brasil [85].

O primeiro relato do gene *bla*_{OXA-51} em *A. baumannii* ocorreu na Argentina em isolados não relacionados geneticamente, no ano de 2004. Entretanto, desde então, já foram reportadas diversas variantes desse gene (OXA-64, -65, -66, -67, -68, -69, -70, -71, -75, -76, -77, -83, -84, -86, -87, -88, -89, -91, -92, -94 e -95), portanto nos referimos ao gene como *bla*_{OXA-51-like} [86,87].

A partir da descoberta dessa enzima, foi realizado um estudo, com objetivo de caracterizá-la, que evidenciou uma grande afinidade da OXA-51 pelo imipenem, no entanto não foram observadas propriedades cinéticas sobre o meropenem [88].

O gene cromossomal *bla*_{OXA-51-like} tem sido muito utilizado como marcador da espécie *A. baumannii* pelo fato de ser intrínseco a mesma [105]. No entanto, Lee e colaboradores evidenciaram pela primeira vez esse gene em outra espécie de *Acinetobacter* (genomoespécie 13TU, atualmente designada *A.nosocomialis*) [89].

Estudos já relacionaram a presença do elemento *ISAba1 upstream* ao gene *bla*_{OXA-51-like} com fenótipos de resistência aos carbapenêmicos. Esses dados demonstram, que apesar de intrínseco, a presença desse gene associado à um elemento de inserção pode acarretar em uma diminuição da suscetibilidade aos carbapenêmicos [9,90].

2.6.3 Metallo-β-lactamases

As metalo-β-lactamases (MβL) são enzimas pertencentes à classe B de Ambler e ao grupo 3 da classificação de Bush & Jacoby [75]. Embora as MβL sejam menos encontradas em *A. baumannii* do que as oxacilinasas, essas enzimas possuem uma capacidade hidrolítica contra carbapenêmicos de 100 a 1000 vezes maior que das oxacilinasas, além de serem resistentes a inibidores de β-lactamases como sulbactam e clavulanato [8,91]. As MβL são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, mas não possuem atividade contra o

aztreonam. O zinco é o principal cofator dessa enzima e, devido a essa característica, as M β L perdem sua atividade na presença do EDTA, um quelante de zinco e outros cátions bivalentes [74].

A partir da década de 90, novos genes que codificam M β L foram descritos em patógenos clinicamente importantes como *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., e membros da família Enterobacteriaceae [92]. Esses novos genes que codificam M β Ls estão inseridos em elementos genéticos móveis tais como transposons e integrons. Esses elementos são capazes de promover a disseminação desses genes, conhecidos portanto como M β L móveis ou adquiridas. Os genes que codificam as enzimas IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase) e GIM (*German* imipenemase) estão inseridos em cassetes gênicos localizados em integrons de classe 1. Os genes codificadores de IMP também podem ser encontrados em integrons de classe 3 [93].

Até o momento, existem poucos relatos de M β L em *Acinetobacter* sp. O primeiro caso ocorreu na Itália, com um isolado produtor de IMP-2. A variante IMP-1 foi identificada no Japão, Itália e Coréia do Sul. No Brasil, houve apenas uma descrição de *A. baumannii* produtor de IMP-1. A cepa produtora de M β L foi isolada de uma paciente internada no Hospital São Paulo no ano de 2001, e se mostrou resistente ao imipenem, meropenem e cefalosporinas [94,95].

2.7 Elementos Genéticos Móveis

2.7.1 Elementos transponíveis

Grande parte das transposições no DNA bacteriano envolvem elementos transponíveis. Esses elementos também chamados de transposons, possuem a habilidade de se mover dentro do genoma bacteriano, podendo se translocar de um sítio a outro do DNA, assim como de uma molécula de DNA para outra, como por exemplo, de um plasmídeo à outro ou de um plasmídeo para o

cromossomo [96,97]. A transposição para outros sítios do genoma é considerada uma das principais causas de rearranjos no DNA bacteriano, que conseqüentemente poderá causar mudanças na expressão gênica [98].

A estrutura básica de um transposon é composta por uma proteína chamada transposase, responsável pela mobilidade deste elemento. As extremidades dos transposons geralmente são formadas por *short inverted repeats* (IRs), caracterizadas como sequências necessariamente idênticas ou muito similares que agem como sítios de ligação para as transposases. As IRs são normalmente compostas por 15-40pb, embora raros transposons possam possuir IRs com 80-150pb, contendo múltiplos sítios de ligação para as transposases [98].

Durante os eventos de transposição, as IRs são mantidas nas extremidades dos transposons, isso facilita a inserção na qual ambas extremidades precisam ser ligadas no mesmo sítio. Se o elemento carrega consigo apenas a capacidade e função de transposição, além de possuir um tamanho de 1-2 kb, esse é chamado de sequência de inserção (IS). Se o elemento codificar outras funções além da transposição, como por exemplo, genes que promovam resistência à antibióticos, esse elemento é chamado de transposon [97].

Transposons podem variar seu tamanho de 3 kb até 40 kb, carregando consigo até dezenas de genes. Esses elementos são divididos em dois grupos: transposons compostos e transposons complexos [97].

Transposons compostos possuem em sua região central genes de resistência, além disso são flanqueados por sequências de inserção (IS). Essas IS podem se transpor ou mobilizar o transposon inteiro junto consigo. Os elementos IS codificam uma transposase responsável tanto pela criação de um sítio de ligação do transposon, quanto pelo reconhecimento das extremidades do mesmo. Esse tipo de transposon pode ser encontrado tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas [98].

Transposons complexos possuem uma estrutura genética mais complexa quando comparado à elementos IS ou transposons compostos. O clássico transposon complexo é o Tn3, derivado do plasmídio de resistência R1 [99]. Esse transposon codifica a β -lactamase TEM-1, que confere resistência à ampicilina, carbenicilina e cefalosporinas de primeira geração. Tn3 está amplamente distribuído em bactérias ambientais ou do ambiente hospitalar, como as da família Enterobacteriaceae ou *Pseudomonas aeruginosa*, sendo também comumente encontrado em plasmídios [97].

Elementos transponíveis podem promover rearranjos no genoma direta ou indiretamente:

- O evento da transposição pode por si só causar deleções, inversões ou até mesmo levar a movimentação de uma sequência para outro local do hospedeiro.
- Transposons servem como substratos para sistemas de recombinação celular agindo como “regiões de homologia”; duas cópias de um mesmo transposon em posições diferentes no cromossomo podem servir como sítios de recombinação. Essas trocas podem resultar em deleções, inserções, inversões e translocações [98].

A partir desses eventos de transposição, bactérias podem adquirir uma vantagem seletiva sobre aquelas que não sofreram rearranjo, permanecendo mais tempo no ambiente e adquirindo maior capacidade de propagação. Entretanto, como já citado acima, transposições no genoma bacteriano também podem causar deleções ou inativações de genes que podem, por sua vez, conferir danos à bactéria.

2.7.2 Sequências de Inserção (IS)

As sequências de inserção (IS) bacterianas são o tipo mais simplificado de elemento transponível, raramente ultrapassando o tamanho de 2kb. As IS são unidades autônomas responsáveis por codificar proteínas que atuam apenas na transposição desse elemento. Cada IS possui diferenças em suas sequências, entretanto possuem algumas estruturas comuns em sua organização. Toda IS, possui pequenas IRs terminais que definem suas extremidades, além de possuírem uma *open reading frame* (ORF), responsável por codificar uma transposase [97,98,100].

Quando uma IS se transpõe, o sítio alvo de inserção no hospedeiro se duplica, formando as chamadas *direct repeats* (DRs). A sequência de cada *direct repeat* varia de acordo com o evento de transposição, mas a maioria dessas sequências possui um comprimento de 9pb. Sequências de inserção podem se integrar a uma variedade de sítios do genoma do hospedeiro, podendo ser encontrados no cromossomo ou em plasmídios. Essas sequências de inserção possuem preferências por determinadas regiões do genoma e seu número de cópias pode variar de uma espécie para outra [98,101].

As sequências de inserção podem causar mutações e rearranjos no genoma bacteriano, aumentando a disseminação de determinantes de resistência e virulência intra-espécies. As IS possuem papel importante na disseminação de genes de resistência pois fornecem mobilidade à esses genes [97,98].

Além de possuírem papel de transposição, algumas sequências de inserção atuam na ativação ou no aumento da expressão de genes localizados adjacentes a elas [100]. Essa ativação de genes vizinhos já foi descrita em diversas famílias de sequências de inserção como IS1, IS2, IS3, IS4, IS5 e IS10. Esse fenômeno pode ser devido à presença de regiões promotoras no

elemento de inserção ou pela formação de novos promotores após a inserção [102].

A importância dos elementos IS na resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* tem sido bastante descrita. Estudos têm demonstrado que alguns elementos IS, especialmente IS*Aba1*, possuem um importante papel na resistência de *A. baumannii*. O elemento IS*Aba1* pertence a família IS4, possui IRs de 11pb, além de estar flanqueado por DRs de 9pb [9,10,103]. Esses elementos são considerados exclusivos de *Acinetobacter baumannii*, entretanto, Segal e colaboradores identificaram o elemento IS*Aba1* em isolados de *Acinetobacter lwoffii* sensíveis a todos antimicrobianos testados, exceto ao cotrimoxazol. Nesse mesmo estudo, foi evidenciado que podem haver diversas cópias de IS*Aba1* por genoma bacteriano [10].

IS*Aba1* tem sido frequentemente encontrado na região *upstream* de genes como *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{AmpC}. Esse elemento de inserção fornece uma sequência promotora capaz de propiciar a hiperexpressão desses genes de resistência. Em estudo realizado por Turton e colaboradores, os autores sugerem que os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51} conferem resistência aos carbapenêmicos quando acompanhados do elemento IS*Aba1* [8,9]. IS*Aba2*, IS*Aba3* e IS*Aba4* também já foram identificados localizados *upstream* aos genes *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-23} em isolados de *A. baumannii* [8,104].

O gene *bla*_{OXA-23-like} pode ser encontrado flanqueado por duas cópias de IS*Aba1*, formando um transposon composto (Tn2006), ou então pode estar adjacente à apenas uma cópia de IS*Aba1*, no caso do Tn2008 [11,105]. Em estudo realizado por Wang e colaboradores, Tn2008 foi descrito como o principal meio de disseminação do gene *bla*_{OXA-23-like} na China. Nesse estudo, os autores afirmam que apenas uma cópia de IS*Aba1* adjacente ao gene *bla*_{OXA-23} é capaz de movê-lo [105].

No ano de 2007, foi identificado na Bélgica o primeiro isolado de *A. baumannii* contendo o elemento de inserção IS*Aba4*. O isolado, denominado GIL1 continha, na região *upstream* ao gene *bla*_{OXA-23}, o elemento IS*Aba4* com uma organização genética similar ao Tn2007. Esse elemento demonstrou

grande capacidade de disseminação, além de promover a superexpressão de *bla*_{OXA-23} em *A. baumannii* [106].

Em trabalho realizado por Lee e colaboradores foi identificada uma nova IS envolvida na resistência aos carbapenêmicos. Os autores encontraram um elemento de 1.203pb inserido na sequência de inserção *IS**Aba1* localizada *upstream* ao gene *bla*_{OXA-23} e, evidenciaram que esta sequência, denominada *IS**Aba10* poderia aumentar em 2 a 5 vezes a expressão de *bla*_{OXA-23}. Baseado nessas evidências, sugere-se que *IS**Aba10* possui importante papel na resistência aos carbapenêmicos por fornecer uma sequência promotora adicional ao gene *bla*_{OXA-23} [104].

Sequências de inserção também são importantes para a expressão da resistência à outros antimicrobianos, como por exemplo, celafosporinas [61,107]. Em estudo realizado por Héritier e colaboradores foi demonstrado que o elemento *IS**Aba1* *upstream* ao gene *bla*_{AmpC} promove resistência a ceftazidima em isolados de *A. baumannii* [68].

2.7.3 Integrons

A disseminação da resistência aos antimicrobianos tem levado a descoberta de diversos elementos genéticos móveis como transposons e plasmídios conjugativos. Estudos comparativos destes elementos resultou na descoberta dos integrons – sistemas de expressão que incorporam *open reading frames* (ORFs) por recombinação sítio-específica e as convertem em genes funcionais devido a presença de uma sequência promotora nestes elementos [108-110].

Um integron é uma unidade genética que inclui os componentes necessários para um sistema de recombinação sítio-específica capaz de capturar e mobilizar genes inseridos em cassetes gênicos. Estes determinantes presentes em integrons, incluem um sítio de reconhecimento para cassetes gênicos chamado *attI*, onde o cassete gênico será inserido; o gene *int*, que

codifica para uma recombinase sítio-específica pertencente a família das integrases, e é responsável pela captura do cassete gênico; e um promotor (P_c) responsável pela expressão destes genes inseridos (Figura 2) [110,111].

O termo integron foi designado inicialmente em 1989 por Stokes & Hall, para descrever o grupo de elementos móveis que continham um ou mais genes de resistência à antibióticos localizados em um sítio específico, além de conter os determinantes da recombinação sítio-específica responsáveis pela inserção de genes de resistência [110,112]. Os integrons podem ser divididos em dois grandes grupos: os integrons de resistência (RI) e os super-integrons (SI). Os integrons de resistência carregam a maioria dos cassetes gênicos que codificam para a resistência à antimicrobianos e agentes desinfetantes, podendo estar localizados no cromossomo ou em plasmídios. Já os super-integrons são encontrados apenas no cromossomo contendo cassetes gênicos responsáveis por diversas funções [113].

Até o momento já foram descritas cinco diferentes classes de integrons baseadas nas sequências de suas respectivas integrases. Sabe-se que essas classes possuem um importante papel na disseminação de genes de resistência à antimicrobianos [109]. As classes 1, 2 e 3 já estão claramente descritas na literatura e mostram-se associadas à fenótipos de multirresistência aos antimicrobianos [114]. As outras duas classes de integrons estão relacionadas ao desenvolvimento de resistência a trimetoprim em espécies de *Vibrio* spp. [115].

Integrons de classe 1 são os mais disseminados e com a maior importância clínica dentre todas as classes, sendo detectados em 22% a 59% das bactérias gram-negativas, embora também possam ser evidenciados em bactérias gram-positivas [115,116]. Integrons de classe 1 vêm sendo descritos em isolados de *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Citrobacter* spp., *Campylobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp. e *Vibrio* spp. [113,115].

Devido a sua maior disseminação, integrons de classe 1 constituem o principal modelo experimental de integrons. Essa classe está normalmente associada à transposons funcionais ou não funcionais derivados do Tn402, esse último podendo estar inserido em transposons maiores como o Tn21. Integrons de classe 1 têm sido associados à uma variedade de sequências de inserção incluindo IS26, IS1999, IS2000 e IS6100 [113].

Integrons de classe 2 estão inseridos na família de transposons Tn7 e consistem de uma integrase seguida de cassetes gênicos. Essa classe de integrons já foi descrita em *Acinetobacter* sp., *Shigella* sp. e *Salmonella* sp. e pode conter os cassetes gênicos *aadA1*, *dfrA1* e *sat* [113,117].

Os integrons de classe 3 são ainda menos frequentes que os de classe 2 e também estão localizados em transposons. Integrons de classe 3 foram descritos em *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas putida* e *Klebsiella pneumoniae* [113].

Todas as três classes de integrons possuem um segmento 5' conservado, que possui o gene *intl* e um sítio *att*, entretanto, possuem segmentos 3' distintos. Nos integrons de classe 1, o segmento 3' inclui três ORFs: *qacE* Δ 1, derivado do gene *qacE*, responsável por resistência à antisépticos; *sul1*, gene de resistência às sulfonamidas; e ORF5, de função desconhecida até o momento (Figura 2) [118]. Integrons de classe 2 possuem em seu segmento 3' cinco genes *tns*, responsáveis pela mobilidade do transposon Tn7 no qual estão inseridos. O segmento 3' dos integrons de classe 3 não foi caracterizado até o momento [118].

Análises detalhadas da região *upstream* de integrases demonstraram recentemente a conservação de uma sequência motivo que sobrepõe parcialmente o elemento promotor -10 de *intl*. O estudo dessas sequências revelou que elas correspondem aos sítios de ligação de LexA em *E. coli*. LexA é um repressor transcricional que controla o sistema SOS de resposta. Este sistema é caracterizado por ser uma rede de circuitos regulatórios responsáveis por evitar ou corrigir danos ao DNA [119,120].

O sistema SOS é uma resposta bacteriana induzida quando há uma taxa anormal de DNA de fita simples na célula. Esse aumento de DNA de fita simples na célula pode ser devido a diversos fatores como, tratamento com antibióticos (fluorquinolonas, β -lactâmicos e trimetoprim) ou com mitomicina C, radiação UV e danos durante a replicação de DNA [121]. Guerin e colaboradores demonstraram que durante a resposta SOS, pode ocorrer um aumento da expressão da integrase em 4,5 vezes em integrons de classe 1 de *E. coli* [122].

Nos últimos anos, a resposta SOS tem sido ligada a diversos fenótipos clinicamente relevantes, que incluem o aumento de alelos de resistência à antibióticos, resultado de hipermutações, ativação e disseminação de fatores de virulência inseridos em bacteriófagos, transposons, ilhas de patogenicidade, e elementos conjugativos de integração (ICEs) codificando genes de resistência à antimicrobianos [120,123].

Os integrons são apontados como uma das causas do aumento da resistência de *A. baumannii* aos antimicrobianos devido a presença de cassetes gênicos inseridos nestes elementos [12]. Mais de 130 diferentes cassetes contendo genes de resistência já foram identificados em integrons. Juntos, estes cassetes são capazes de promover resistência à maioria das classes de antimicrobianos incluindo β -lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, trimetoprim, estreptomicina, rifampicina, eritromicina, fosfomicina, lincomicina, quinolonas e compostos quaternário de amônia [13,115].

Integrons de classe 1 e 2 têm sido descritos em isolados de *A. baumannii* relacionados a surtos de infecção hospitalar. Em estudo realizado por Turton e colaboradores observou-se que todos os isolados de *A. baumannii* associados a surtos continham integrons de classe 1, entretanto nenhum isolado esporádico apresentou essa classe de integron. Além disso, nesse estudo nenhum isolado apresentou integrons de classe 2 [124]. Integrons de classe 1 são descritos em maior prevalência na Europa, Ásia e Estados Unidos [124-126]. No entanto, estudos realizados em países da América Latina, como Chile, Argentina e Brasil demonstram uma maior distribuição de integrons de

classe 2 entre os isolados de *A. baumannii* [117,127,128]. Desse modo, é possível inferir que existe uma influência geográfica na distribuição epidemiológica das diferentes classes de integrons.

2.7.4 Cassetes Gênicos

Um cassete gênico é um elemento genético não replicativo, contendo uma região codificadora do gene e um sítio de recombinação chamado de elemento base 59 (59-be) ou *attC* [129,130]. Esses elementos se apresentam de forma linear dentro do cromossomo, plasmídeo ou transposon, no entanto, quando estão livres são encontrados de maneira circular, com tamanhos variando de 200-1500pb [113]. A princípio, não existe um limite para o número de cassetes gênicos que possam ser capturados por um integron. No entanto, restrições funcionais, como a redução da expressão gênica pelo progressivo distanciamento do gene da região promotora, podem limitar esse número na prática [131].

Para cada família de antimicrobianos, genes distintos são evidenciados nos cassetes gênicos. As enzimas codificadas conferem resistência por diferentes mecanismos, como acetiltransferases que modificam cloranfenicol ou aminoglicosídeos; dihidrofolato redutases causadoras de resistência a trimetoprim, além de β -lactamases que degradam uma série de antimicrobianos β -lactâmicos. Além desses genes, diversas ORFs sem função conhecida têm sido identificadas em cassetes gênicos [132].

Diversos genes de resistência já foram evidenciados em cassetes gênicos (Tabela 2). Numerosas combinações de cassetes gênicos já foram descritas, assim como múltiplas cópias desses em um mesmo integron, como por exemplo, a presença de duas cópias de *oxa2* [133]. A maioria dos cassetes gênicos codificam resistência à antimicrobianos já utilizados por um longo período, entretanto, já estão sendo descritos cassetes gênicos contendo genes

como *bla*_{IMP}, *bla*_{VEB-1}, *oxa*-15, *oxa*-19, *oxa*-20, *oxa*-21 e *oxa*-37, responsáveis pela resistência à novos antimicrobianos [12,134,135].

A contínua descrição de cassetes gênicos em integrons, principalmente aqueles com mecanismos de resistência direcionados contra novos antibióticos β -lactâmicos e fluorquinolonas, vem sendo motivo de grandes preocupações. Além disso, o número de genes de resistência inseridos no mesmo plasmídeo, e até no mesmo integron, parece estar crescendo. Essa integração de determinantes de resistência num mesmo plasmídeo pode acarretar em grandes problemas de saúde pública. Provavelmente, esses elementos portadores de multirresistência serão capazes de permanecer por longos períodos no ambiente, pois a associação física de integrons com outros determinantes de resistência irão possibilitar sua contínua seleção [113,136].

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Analisar a associação da presença de elementos genéticos móveis com a resistência aos antimicrobianos em isolados de *Acinetobacter baumannii* da cidade de Porto Alegre.

Objetivos específicos:

1. Determinar a prevalência de integrons de classe 1 e 2 nos diferentes clones de *A. baumannii*.
2. Identificar a presença dos genes *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} and *bla*_{OXA-143}.
3. Relacionar a presença do elemento de inserção *ISAba1* com a resistência aos carbapenêmicos.
4. Identificar a presença das sequências de inserção *ISAba1 upstream* aos genes *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-23-like}.
5. Avaliar o perfil de suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos imipenem, meropenem, caftazidima, polimixina e ampicilina-sulbactam.

REFERÊNCIAS

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL: ***Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen.** *Clinical Microbiology Reviews* 2008, **21**:538-582.
2. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ: ***Acinetobacter* spp, as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features.** *Clinical Microbiology Reviews* 1996, **9**:148-165.
3. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H: **An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Nature Reviews Microbiology* 2007, **5**:939-951.
4. 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?** *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2003, **24**:275-279.
5. Paterson DL: **The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species.** *Clinical Infectious Diseases* 2006, **43**:S43-S48.
6. 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: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** *International Journal of Infectious Diseases* 2004, **8**:284-291.
7. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H: **Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010, **65**:233-238.

8. Poirel L, Nordmann P: **Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology.** *Clinical Microbiology and Infection* 2006, **12**:826-836.
9. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL: **The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*.** *FEMS Microbiology Letters* 2006, **258**:72-77.
10. Segal H, Garny S, Elisha BG: **Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*?** *FEMS Microbiol Letters* 2005, **243**:425-429.
11. Mugnier PD, Poirel L, Nordmann P: **Functional Analysis of Insertion Sequence ISAbal, Responsible for Genomic Plasticity of *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Bacteriology* 2009, **191**:2414-2418.
12. Navia MM, Ruiz J, Vila J: **Characterization of an integron carrying a new class D beta-lactamase (OXA-37) in *Acinetobacter baumannii*.** *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* 2002, **8**:261-265.
13. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR: **Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons.** *FEMS Microbiology Reviews* 2009, **33**:757-784.
14. Cambray G, Guerout AM, Mazel D: **Integrons.** *Annual Review of Genetics* 2010, **44**:141-166.
15. Juni E: **Genetics and Physiology of *Acinetobacter*.** *Annual Review of Microbiology* 1978, **32**:349-371.
16. Rossau R, Vanlandschoot A, Gillis M, Deley J: **Taxonomy of Moraxellaceae fam-nov, a new bacterial family to accommodate the**

- genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1991, **41**:310-319.
17. Bouvet PJM, Grimont PAD: **Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter-baumannii* sp-nov, *Acinetobacter-haemolyticus* sp-nov, *Acinetobacter-johnsonii* sp-nov, and *Acinetobacter-junii* sp-nov and emended descriptions of *Acinetobacter-calcoaceticus* and *Acinetobacter-lwoffii*.** *International Journal of Systematic Bacteriology* 1986, **36**:228-240.
 18. Nishimura Y, Ino T, Iizuka H: ***Acinetobacter-radioresistens* sp-nov isolated from cotton and soil.** *International Journal of Systematic Bacteriology* 1988, **38**:209-211.
 19. Bouvet PJM, Jeanjean S: **Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*.** *Research in Microbiology* 1989, **140**:291-299.
 20. Tjernberg I, Ursing J: **Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization.** *Apmis* 1989, **97**:595-605.
 21. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, Vaneechoutte M, Brisse S, Dijkshoorn L: **Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp nov (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp nov (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU).** *Research in Microbiology* 2011, **162**:393-404.
 22. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J: **Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species.** *Journal of Clinical Microbiology* 1991, **29**:277-282.

23. Joly-Guillou ML: **Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter***. *Clinical Microbiology and Infection* 2005, **11**:868-873.
24. Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K: ***Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health?** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008, **32**:106-119.
25. Chen MZ, Hsueh PR, Lee LN, Yu CJ, Yang PC, Luh KT: **Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii***. *Chest* 2001, **120**:1072-1077.
26. Oncul O, Keskin O, Acar HV, Kucukardali Y, Evrenkaya R, Atasoyu EM, Top C, Nalbant S, Ozkan S, Emekdas G, et al.: **Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake**. *Journal of Hospital Infection* 2002, **51**:47-51.
27. Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ: **Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers**. *Emerging Infectious Diseases* 2005, **11**:1218-1224.
28. Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, Fishbain J, Craft D, Riddell S, Lindler L, et al.: **An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq**. *Clinical Infectious Diseases* 2007, **44**:1577-1584.
29. Nicolau DP: **Carbapenems: a potent class of antibiotics**. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2008, **9**:23-37.
30. Kattan JN, Villegas MV, Quinn JP: **New developments in carbapenems**. *Clinical Microbiology and Infection* 2008, **14**:1102-1111.

31. Van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ: **Acquired antibiotic resistance genes: an overview.** *Front Microbiol* 2011, **2**:203.
32. Fishbain J, Peleg AY: **Treatment of *Acinetobacter* Infections.** *Clinical Infectious Diseases* 2010, **51**:79-84.
33. Ikonomidis A, Pournaras S, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A: **Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006, **28**:376-377.
34. Rhomberg PR, Jones RN, Grp MPUS: **Antimicrobial spectrum of activity for meropenem and nine broad spectrum antimicrobials: report from the MYSTIC Program (2002) in North America.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2003, **47**:365-372.
35. Garcia-Rodriguez JA, Jones RN, Mystic Programme Study G: **Antimicrobial resistance in gram-negative isolates from European intensive care units: Data from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Programme.** *Journal of Chemotherapy* 2002, **14**:25-32.
36. Jones RN, Sader HS, Beach ML: **Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18 569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001).** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2003, **22**:551-556.
37. Paterson DL, DePestel DD: **Doripenem.** *Clinical Infectious Diseases* 2009, **49**:291-298.
38. Nordmann P, Picazo JJ, Mutters R, Korten V, Quintana A, Laeuffer JM, Seak JCH, Flamm RK, Morrissey I, Grp CS: **Comparative activity of**

- carbapenem testing: the COMPACT study.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011, **66**:1070-1078.
39. Alekshun MN, Levy SB: **Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance.** *Cell* 2007, **128**:1037-1050.
40. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG: **Bad bugs need drugs: An update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America.** *Clinical Infectious Diseases* 2006, **42**:657-668.
41. Barbolla RE, Centron D, Di Martino A, Maimone S, Salgueira C, Famiglietti A, Vay C, Catalano M: **Identification of an epidemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain at hospitals in Buenos Aires City.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2003, **45**:261-264.
42. Houang ETS, Chu YW, Leung CM, Chu KY, Berlau J, Ng KC, Cheng AFB: **Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong.** *Journal of Clinical Microbiology* 2001, **39**:228-234.
43. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza H, Castro MES, Stier CJN, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Penteado SR, Livermore DM, Woodford N: **Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil.** *Journal of Clinical Microbiology* 2003, **41**:3403-3406.
44. Chang HL, Tang CH, Hsu YM, Wan L, Chang YF, Lin CT, Tseng YR, Lin YJ, Sheu JJC, Lin CW, et al.: **Nosocomial Outbreak of Infection With Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Medical Center in Taiwan.** *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2009, **30**:34-38.
45. Levy SB, Marshall B: **Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.** *Nature Medicine* 2004, **10**:S122-S129.

46. Livermore DM: **Bacterial resistance: Origins, epidemiology, and impact.** *Clinical Infectious Diseases* 2003, **36**:S11-S23.
47. Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J: **Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007, **59**:1210-1215.
48. Rowe-Magnus DA, Mazel D: **The role of integrons in antibiotic resistance gene capture.** *International Journal of Medical Microbiology* 2002, **292**:115-125.
49. Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW: **Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution.** *Fems Microbiology Reviews* 2009, **33**:376-393.
50. Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, MacDonald IJ, Martin KM, Russo T, Campagnari AA, et al.: **Comparative Genome Sequence Analysis of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Bacteriology* 2008, **190**:8053-8064.
51. Kim YJ, Kim SI, Kim YR, Hong KW, Wie SH, Park YJ, Jeong H, Kang MW: **Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: diversity of resistant mechanisms and risk factors for infection.** *Epidemiol Infect* 2011, **18**:1-9.
52. Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J: **Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: Citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage.** *Clinical Infectious Diseases* 2000, **31**:101-106.
53. Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ: **Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST**

- and the in vitro activity of tigecycline.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007, **60**:1018-1029.
54. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A: **Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003, **51**:565-574.
55. Queenan AM, Bush K: **Carbapenemases: the versatile beta-lactamases.** *Clinical Microbiology Reviews* 2007, **20**:440-458.
56. Bush K, Jacoby GA: **Updated Functional Classification of beta-Lactamases.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010, **54**:969-976.
57. Walsh TR: **Clinically significant carbapenemases: an update.** *Current Opinion in Infectious Diseases* 2008, **21**:367-371.
58. Livermore DM, Woodford N: **The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*.** *Trends in Microbiology* 2006, **14**:413-420.
59. Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Helfand MS, Bethel CR, Thomson JM, Anderson VE, Barlow M, Rice LB, et al.: **Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: Defining a unique family of class C enzymes.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005, **49**:2941-2948.
60. Pasteran F, Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M, Vazquez M, Procopio A, Tokumoto M, Cagnoni V: **Emergence of PER-2 and**

- VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006, **50**:3222-3224.
61. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P: **Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital.** *Journal of Clinical Microbiology* 2003, **41**:3542-3547.
62. Naas T, Nordmann P: **OXA-type beta-lactamases.** *Current Pharmaceutical Design* 1999, **5**:865-879.
63. Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC: **Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region.** *Journal of Clinical Microbiology* 2005, **43**:1632-1639.
64. Moubareck C, Bremont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T: **GES-11, a Novel Integron-Associated GES Variant in *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009, **53**:3579-3581.
65. Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, Arakawa Y: **Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward.** *Journal of Clinical Microbiology* 2004, **42**:3978-3984.
66. Robledo IE, Aquino EE, Sante MI, Santana JL, Otero DM, Leon CF, Vazquez GJ: **Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010, **54**:1354-1357.
67. Jacoby GA: **AmpC beta-Lactamases.** *Clinical Microbiology Reviews* 2009, **22**:161-182.

68. Heritier C, Poirel L, Nordmann P: **Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAb₁ in *Acinetobacter baumannii*.** *Clinical Microbiology and Infection* 2006, **12**:123-130.
69. Brown S, Amyes S: **OXA beta-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006, **57**:1-3.
70. Poirel L, Naas T, Nordmann P: **Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D beta-Lactamases.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010, **54**:24-38.
71. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P: **Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences.** *Future Microbiology* 2007, **2**:501-512.
72. Walther-Rasmussen J, Hoiby N: **OXA-type carbapenemases.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006, **57**:373-383.
73. Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young HK: **Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000, **44**:196-199.
74. Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P: ***Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008, **52**:1252-1256.
75. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P: **Worldwide Dissemination of the bla_{OXA-23} Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*.** *Emerging Infectious Diseases* 2010, **16**:35-40.
76. Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, Palepou MF, Pike R, Pitt TL, Patel BC, et al.: **Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple**

- hospitals in London and southeast England.** *Journal of Clinical Microbiology* 2006, **44**:3623-3627.
77. Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, Machado A, Barth AL: **Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme: Dissemination in Southern Brazil.** *Infection* 2009, **37**:474-476.
78. 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.** *Journal of Clinical Microbiology* 2005, **43**:4826-4829.
79. Stoeva T, Higgins PG, Bojkova K, Seifert H: **Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital.** *Clinical Microbiology and Infection* 2008, **14**:723-727.
80. Kusradze I, Diene SM, Goderdzishvili M, Rolain JM: **Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011, **38**:164-168.
81. Sevillano E, Gallego L, Garcia-Lobo JM: **First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*.** *Pathologie Biologie* 2009, **57**:493-495.
82. Da Silva GJ, Quinteira S, Bértolo E, Sousa JC, Gallego L, Duarte A, Peixe L, Group PRS: **Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004, **54**:255-258.

83. Werneck J, Picão RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales A: **OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011, **66**: 452-453.
84. Marqué S, Poirel L, Héritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R, Coman G, Naas T, Nordmann P: **Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe.** *Journal of Clinical Microbiology* 2005, **43**:4885-4888.
85. Figueiredo DQ, Santos KR, Pereira EM, Schuenck RP, Mendonça-Souza CR, Teixeira LM, Mondino SS: **First report of the blaOXA-58 gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011, **106**:368-370.
86. Brown S, Amyes SGB: **The sequences of seven class D beta-lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents.** *Clinical Microbiology and Infection* 2005, **11**:326-329.
87. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL: **Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species.** *Journal of Clinical Microbiology* 2006, **44**:2974-2976.
88. Brown S, Young HK, Amyes SGB: **Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina.** *Clinical Microbiology and Infection* 2005, **11**:15-23.
89. Lee YT, Turton JF, Chen TL, Wu RCC, Chang WC, Fung CP, Chen CP, Cho WL, Huang LY, Siu LK: **First Identification of bla_{OXA-51-like} in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp.** *Journal of Chemotherapy* 2009, **21**:514-520.

90. Srinivasan VB, Rajamohan G, Pancholi P, Stevenson K, Tadesse D, Patchanee P, Marcon M, Gebreyes WA: **Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA.** *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2009, **8**:21.
91. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM: **Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams?** *Lancet Infectious Diseases* 2011, **11**:381-393.
92. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P: **Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000, **44**:891-897.
93. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P: **Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?** *Clinical Microbiology Reviews* 2005, **18**:306-325.
94. Tognim MCB, Gales AC, Penteadó AP, Silbert S, Sader HS: **Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital.** *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2006, **27**:742-747.
95. Gales AC, Tognim MCB, Reis AO, Jones RN, Sader HS: **Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2003, **45**:77-79.
96. Bennett PM: **Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria.** *British Journal of Pharmacology* 2008, **153**:S347-S357.

97. Woodford N, Johnson A: **Methods in Molecular Biology: Genomics, Proteomics and Clinical Bacteriology**, Towota, NJ: Humana Press 2005, vol 266.
98. Lewin B: **Genes VIII**, edn 8. New York, NY: Oxford University Press 2004:467-480.
99. Casadaban MJ, Chou J, Cohen SN: **Overproduction of the Tn3 transposition protein and its role in DNA transposition**. *Cell* 1982, **28**:345-354.
100. Mahillon J, Chandler M: **Insertion sequences**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998, **62**:725-774.
101. Dale J, Park S: **Molecular Genetics of Bacteria**. edn 4. Chichester, West Sussex: Wiley; 2004.
102. Berg D, Howe M: **Mobile DNA**. Washington DC: American Society for Microbiology; 1989.
103. Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P: **Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter baumannii***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007, **51**:1530-1533.
104. Lee Y, Kim CK, Lee H, Jeong SH, Yong D, Lee K: **A Novel Insertion Sequence, IS*Aba10*, Inserted into IS*Aba1* Adjacent to the *bla*_{OXA-23} Gene and Disrupting the Outer Membrane Protein Gene *carO* in *Acinetobacter baumannii***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011, **55**:361-363.
105. Wang XH, Zong ZY, Lu XJ: **Tn2008 is a major vehicle carrying *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter baumannii* from China**. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011, **69**:218-222.

106. Bogaerts P, Cuzon G, Naas T, Bauraing C, Deplano A, Lissou B, Nordmann P, Glupczynski Y: **Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Expressing the *bla*_{OXA-23} Gene Associated with IS*Aba4* in Belgium.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008, **52**:4205-4206.
107. Poirel L, Cabanne L, Vahaboglu H, Nordmann P: **Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase *bla*_{PER-1} gene in gram-negative bacteria.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005, **49**:1708-1713.
108. Rowe-Magnus DA, Mazel D: **Integrans: natural tools for bacterial genome evolution.** *Current Opinion in Microbiology* 2001, **4**:565-569.
109. Mazel D: **Integrans: agents of bacterial evolution.** *Nature Reviews Microbiology* 2006, **4**:608-620.
110. Hall RM, Collis CM: **Mobile gene cassettes and integrans - capture and spread of genes by site-specific recombination.** *Molecular Microbiology* 1995, **15**:593-600.
111. Hall RM, Stokes HW: **Integrans or super integrans?** *Microbiology-Sgm* 2004, **150**:3-4.
112. Stokes HW, Hall RM: **A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions - Integrans.** *Molecular Microbiology* 1989, **3**:1669-1683.
113. Fluit AC, Schmitz FJ: **Resistance integrans and super-integrans.** *Clinical Microbiology and Infection* 2004, **10**:272-288.
114. Hall RM: **Mobile gene cassettes and integrans: Moving antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria.** *Antibiotic Resistance:*

Origins, Evolution, Selection and Spread. North Ryde: Ciba Foundation Symposia; 1997, vol 207:192-202.

115. Cambray G, Guerout AM, Mazel D: **Integrans**. *Annual Review of Genetics* 2010, **44**:141-166.
116. Nesvera J, Hochmannova J, Patek M: **An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum***. *FEMS Microbiology Letters* 1998, **169**: 391-395.
117. Gonzalez G, Sossa K, Bello H, Dominguez M, Mella S, Zemelman R: **Presence of integrans in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals**. *FEMS Microbiology Letters* 1998, **161**:125-128.
118. Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T: **Molecular characterization of integrans in *Acinetobacter baumannii*: Description of a hybrid class 2 integron**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000, **44**:2684-2688.
119. Erill I, Campoy S, Barbe J: **Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response**. *FEMS Microbiology Reviews* 2007, **31**:637-656.
120. Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK: **SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes**. *Nature* 2004, **427**:72-74.
121. Baharoglu Z, Bikard D, Mazel D: **Conjugative DNA Transfer Induces the Bacterial SOS Response and Promotes Antibiotic Resistance Development through Integron Activation**. *Plos Genetics* 2010, **6**.

122. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S, Gonzalez-Zorn B, Barbe J, Ploy MC, Mazel D: **The SOS Response Controls Integron Recombination.** *Science* 2009, **324**:1034-1034.
123. Cirz RT, Chin JK, Andes DR, de Crecy-Lagard V, Craig WA, Romesberg FE: **Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance.** *Plos Biology* 2005, **3**:1024-1033.
124. Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R, Pitt TL: **Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom.** *Journal of Clinical Microbiology* 2005, **43**:3074-3082.
125. Golanbar GD, Lam CK, Chu YM, Cueva C, Tan SW, Silva I, Xu HH: **Phenotypic and Molecular Characterization of *Acinetobacter* Clinical Isolates Obtained from Inmates of California Correctional Facilities.** *Journal of Clinical Microbiology* 2011, **49**:2121-2131.
126. Lee YT, Huang LY, Chen TL, Siu LK, Fung CP, Cho WL, Yu KW, Liu CY: **Gene cassette arrays, antibiotic susceptibilities, and clinical characteristics of *Acinetobacter baumannii* bacteremic strains harboring class 1 integrons.** *Journal of Microbiology Immunology and Infection* 2009, **42**:210-219.
127. Oh JY, Kim KS, Jeong YW, Cho JW, Park JC, Lee JC: **Epidemiological typing and prevalence of integrons, in multiresistant *Acinetobacter* strains.** *APMIS* 2002, **110**:247-252.
128. Fonseca EL, Freitas FD, Scheidegger EMD, Jacinto T, Vicente ACP: **Class 2 integrons in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in different Brazilian geographic regions.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011, **38**:95-96.

129. Stokes HW, Ogorman DB, Recchia GD, Parsekhian M, Hall RM: **Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes.** *Molecular Microbiology* 1997, **26**:731-745.
130. Hall RM, Brookes DE, Stokes HW: **Site-specific insertion of genes into integrons - role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point.** *Molecular Microbiology* 1991, **5**:1941-1959.
131. Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P: **Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes.** *Journal of Bacteriology* 2001, **183**:235-249.
132. Recchia GD, Hall RM: **Origins of the mobile gene cassettes found in integrons.** *Trends in Microbiology* 1997, **5**:389-394.
133. Fluit AC, Schmitz FJ: **Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 1999, **18**:761-770.
134. Vila J, Navia M, Ruiz J, Casals C: **Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997, **41**:2757-2759.
135. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P: **Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999, **43**:573-581.
136. Leverstein-van Hall MA, Blok HEM, Donders ART, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J: **Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is**

strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *Journal of Infectious Diseases* 2003, **187**:251-259.

137. Gordon NC, Wareham DW: **Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010, **35**:219-226.
138. Larouche A, Roy PH: **Analysis by Mutagenesis of a Chromosomal Integron Integrase from *Shewanella amazonensis* SB2BT.** *Journal of Bacteriology* 2009, **191**:1933-1940.

ARTIGO

Title: Genetic context of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in southern Brazil

Authors: M. PAGANO¹, A. F. MARTINS², A. B. M. P. MACHADO³, J. BARIN¹,
A. L. BARTH^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, UFRGS.

² Centro Universitário Metodista do IPA.

³ Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Author for correspondence: Mariana Pagano, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos St, 2.350, 1st floor, 90035-903, Santa Cecília, Porto Alegre/RS, Brazil, phone number (55)(51)33598837.

E-mail: mari.pag@hotmail.com

SUMMARY

Over the last decade, *Acinetobacter baumannii* resistant to carbapenems emerged in many medical centers and has been commonly associated with high morbimortality. In this study, potential mechanisms contributing to antimicrobial resistance were investigated in 58 clinical isolates collected from July 2007 to June 2008, during an outbreak period, from five different hospitals from southern Brazil. All isolates studied presented *bla*_{OXA-51-like}, 68.9% presented *bla*_{OXA-23-like}, however none presented *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} or *bla*_{OXA-143}. Integrase gene was detected in 51 (87.9%) isolates, and class 2 integrons were more prevalent (86.2%) among the studied isolates. *ISAb₁* was found upstream of *bla*_{OXA-51-like} and *bla*_{OXA-23-like} however, it was only significantly ($P < 0.001$) to determine carbapenem resistance, when adjacent to *bla*_{OXA-23-like}.

INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii is a nosocomial pathogen widely distributed in hospitals settings and responsible for a wide spectrum of infections, including pneumonia, secondary meningitis, urinary tract infections, wound infections and bacteremias [1]. *A. baumannii* is characterized by its tendency to acquire resistance to multiple classes of antimicrobial agents, including carbapenems [2]. In the last years, carbapenem resistance in *A. baumannii* was mainly associated with five OXA-type carbapenemases subfamilies (*bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} and *bla*_{OXA-143}) [3]. The *ISAb₁* element has been found in association with *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-58-like} and AmpC cephalosporinase. *ISAb₁* appears to provide a promoter sequence able to promote the overexpression of these resistance genes, besides

modulate the mobility of OXA-type genes [4-7]. In addition, the resistance among *A. baumannii* may be linked to the presence of integrons, which contains gene cassettes that carry resistance determinants as described in multiple outbreaks [8-10].

The aim of this study was to determine the frequency of class 1 and 2 integrons in *A. baumannii*, as well as to establish the prevalence of the element *ISAba1* associated with *bla*_{OXA-51-like} and *bla*_{OXA-23-like}, and their correlation with carbapenem resistance in southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Samples selection and identification

In a previous study, 239 isolates of carbapenem-resistant (resistant to meropenem and/or imipenem) *Acinetobacter baumannii* obtained from patients from five hospitals between July 2007 to June 2008 in Porto Alegre city, southern Brazil, were grouped in 14 distinct clonal group by molecular techniques [11].

We selected from that study a total of 41 carbapenem-resistant isolates, representatives of the each clonal group including at least one isolate from the five hospitals. Isolates were obtained from inferior respiratory tract (24), urine (6), catheters (4), blood (5) and others (2). In order, to evaluate the influence of mobile genetic elements in the resistance to carbapenems, 17 carbapenem susceptible *A. baumannii* isolates were also included in the study.

Antimicrobial susceptibility testing

Minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined by broth microdilution and/or using the M.I.C.Evaluators™ method (Oxoid, Basingstoke, UK) to the following antimicrobial agents: ceftazidime (Novafarma, São Paulo, Brazil), ampicillin/sulbactam (Eurofarma, São Paulo, Brazil), polymyxin (Eurofarma, São Paulo, Brazil), imipenem (ABL, São Paulo, Brazil) and meropenem (Eurofarma, São Paulo, Brazil). The susceptibility results were interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines [12]. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as quality control.

PCR assays

Presence of the *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} and *bla*_{OXA-143} was performed by PCR using primers and a multiplex assay described previously [11, 13, 14]. The isolates were screened for the presence of class 1 and class 2 integrons by integrase gene PCR according to Koeleman *et al.* [15].

The insertion sequence IS*Aba1* upstream of *bla*_{OXA-23-like} and *bla*_{OXA-51-like} was sought with the primers IS*Aba1*F and OXA-23-likeR or OXA-51-likeR according to Turton *et al.* [5]. The detection of IS*Aba1*F/OXA-51-likeR was carried out in 25µL volumes containing 1X PCR Buffer, 200µM for dNTPs, 1.0 U Top*Taq* DNA Polymerase (QIAGEN, Hilden, Germany), 10 pmol of each primer and 3µL of bacterial lysate. Reaction to detection of IS*Aba1*F/OXA23-likeR was carried out in 25µL containing 1X PCR Buffer,

200 μ M for dNTPs, 1.0 U TopTaq DNA Polymerase (QIAGEN, Hilden, Germany), 7 pmol of each primer and 10 μ L of bacterial lysate. Cycling conditions for both PCR reactions were set as described by Segal *et al.* [16].

DNA Sequencing and computer analysis of sequencing data

Int1, *Int2*, IS*Aba1*/OXA-51 and IS*Aba1*/OXA-23 genes were sequenced using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer. DNA sequences were analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool and BLAST to search Genbank for homologous nucleic acid sequences.

Statistical analysis

The Fisher's exact test was used to compare discrete variables. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant. All analysis were performed with SPSS 13.0.

RESULTS

Antimicrobial susceptibility testing

All carbapenem-resistant isolates (41; 70.7%) presented a high level of resistance to all the antibiotics tested. The carbapenem-susceptible isolates (17; 29.3%) demonstrated susceptibility to ampicillin-sulbactam and polymyxin B, on the other hand, presented a high level of resistance to ceftazidime. Eight (13.8%) isolates showed resistance to polymyxin, including 1 isolates susceptible to carbapenems.

PCR Assays

All isolates presented *bla*_{OXA-51-like} gene, characteristic of *A. baumannii*. Thirty-nine (67.2%) carbapenem-resistant and 1 (1.7%) carbapenem-susceptible isolates were positive to *bla*_{OXA-23-like} gene. None isolate were positive to *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} or *bla*_{OXA-143}. *ISAbal* was detected upstream of *bla*_{OXA-23-like} gene in almost all (36/39; 92.3%) of the isolates harbouring this gene. All isolates presenting this association were resistant to the carbapenems (meropenem and/or imipenem). Twenty-three (39.5%) isolates presented *ISAbal* upstream of *bla*_{OXA-51-like} gene, 14 of them were *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} positive, 1 *bla*_{OXA-23-like} positive and 8 only displayed the association of *ISAbal/bla*_{OXA-51-like} gene. Isolates carrying the *bla*_{OXA-23-like} gene associated with *ISAbal* displayed the higher MICs for both carbapenems (Table 1). Our results demonstrated a statistically significant ($P < 0.001$) relationship between this association and an increasing of the MICs to carbapenems. It was not observed a statistically significant association between *ISAbal/bla*_{OXA-51-like} and the increasing of carbapenems MICs ($P > 0.05$)

Integrases genes were detected in 51 (87.9%) of the 58 isolates analyzed. All the resistant and 10 (62.5%) susceptible isolates presented the integrase genes. Class 2 integrons were more prevalent (86.2%) than class 1 among the isolates of the study. Thirty-six (62.1%) isolates presented only class 2 integron, 14 (24.1%) isolates presented both classes and only 1 (1.7%) isolate presented exclusively class 1 integron. The polymyxin-resistant isolates (8; 13.8%) had integrons of class 1 and 2.

According to the molecular characterization of resistance determinants of each isolate, 12 profiles were established. Five profiles (1, 2, 4, 5 and 6) included only carbapenem-susceptible isolates, 5 profiles (8, 9, 10, 11 and 12) included carbapenem-resistant isolates only, and isolates from profiles 3 and 7 showed variable susceptibility to carbapenems. Although susceptible isolates displayed ISAb_a1 upstream *bla*_{OXA-51-like}, none isolate of these profiles presented this association with the *bla*_{OXA-23-like} gene (Table 2).

DISCUSSION

A. baumannii is an important nosocomial pathogen, frequently causing outbreaks in intensive care units (UTIs) [17]. Most strains from outbreaks are highly resistant to antibiotics, including to carbapenems, mainly as a consequence of the expression of genes encoding carbapenemases and integrons containing gene cassettes [3]. Therefore, in this study, we evaluated the presence of genetic elements that may be involved in resistance to carbapenems in southern Brazil.

Our study included isolates collected over 1 year period from 5 important hospitals from our city. Besides, we selected different clusters representing each hospital in order to evaluate the presence and dissemination of resistance determinants among different clusters. We detected that among almost all carbapenem-resistant isolates the *bla*_{OXA-23-like} was accompanied by the ISAb_a1 element. This fact showed that the degree of resistance in these isolates was accentuated by the presence of promoter sequences provided by ISAb_a1, leading to expression of the enzyme OXA-23, as

previously demonstrated with European strains [5, 18]. Our results demonstrated a significant ($P < 0.001$) correlation between the presence of IS*Aba1* upstream

*bla*_{OXA-23-like} and carbapenem resistance. The carriage of IS*Aba1* upstream *bla*_{OXA-23-like} in almost all genetically unrelated isolates, present at different times and isolated from different hospital indicates that this genetic context is highly transmissible among different strains of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, as already observed by Mugnier *et al.* [19]. Moreover, IS*Aba1* could confer selective advantage in the hospital environment in case *A. baumannii* survival is dependent on the efficient expression of antibiotic resistance genes.

Nine isolates (15.5%) presenting IS*Aba1* upstream *bla*_{OXA-51-like} were susceptible to carbapenems. One would expect that the combination of IS*Aba1*/*bla*_{OXA-51-like} should confer resistance to the carbapenems, as indicated by Turton *et al.* [5]. However, our data suggest that the promotion of the *bla*_{OXA-51-like} without a proper transcription of the gene is not enough to confer resistance to carbapenems. The lower transcript level of *bla*_{OXA-51-like} might be due to a dysregulation of the transcription process, or even, due to a disruption on *bla*_{OXA-51-like} gene, as already demonstrated [20]. This justify the fact that, in this study, it was not found any statistically significant ($P > 0.05$) relationship between the presence of IS*Aba1* upstream *bla*_{OXA-51-like} and carbapenem resistance.

The results presented here demonstrate the important role of IS*Aba1* element when associated with *bla*_{OXA-23-like} in carbapenem resistance.

However, further studies on the gene expression are required to fully evaluate the role of *ISAbal* on transcription levels of *bla*_{OXA-51-like} and *bla*_{OXA-23-like} genes.

Based on the sequence of the *intl* genes, six classes of integrons have been described [21, 22]. Class 1 integrons are worldwide distributed and by far the most common in clinical isolates of gram-negative bacteria, including the genus *Acinetobacter* [8, 23]. Although class 2 integrons are rare in *Acinetobacter* species in USA, Europe and Asia [8, 22, 24], our study found a high prevalence of this class as demonstrated by other studies from Latin America countries [10, 25, 26]. These integrons classes distribution difference among continents, highlight the geographic influence in integrons dissemination as well as the importance of epidemiological surveys. We found class 1 and/or 2 integrons in all carbapenem-resistant isolates which demonstrates the ability of integrons to harbour gene cassettes to confer antibiotic resistance. In fact, several studies showed an important relationship among integrons, multiple antibiotic resistance and epidemicity of *Acinetobacter baumannii* [8, 27].

It is important to highlight that isolates belonging to profiles 9, 10, 11 and 12 were disseminated among the 5 hospitals involved in the study and remained by a long period in the hospital settings as previously reported by our group [11]. This ability to spread and persist in the hospital environment could, therefore, be attributed to the presence of *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} plus class 2 integron in these isolates. Thus, it is of importance to monitor and control the

spread of such strains by the use of molecular epidemiological tools in order to allow infection control measures.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. **Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H.** An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology* 2007; **5**: 939-951.
2. **Peleg AY, Seifert H, Paterson DL.** *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 2008; **21**: 538-582.
3. **Poirel L, Nordmann P.** Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* 2006; **12**: 826-836.
4. **Heritier C, Poirel L, Nordmann P.** Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAb_a1 in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection* 2006; **12**: 123-130.
5. **Turton JF, et al.** The role of ISAb_a1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *Fems Microbiology Letters* 2006; **258**: 72-77.
6. **Poirel L, Nordmann P.** Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; **50**: 1442-1448.
7. **Mugnier PD, Poirel L, Nordmann P.** Functional Analysis of Insertion Sequence ISAb_a1, Responsible for Genomic Plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology* 2009; **191**: 2414-2418.

8. **Turton JF, et al.** Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; **43**: 3074-3082.
9. **Oh JY, et al.** Epidemiological typing and prevalence of integrons, in multiresistant *Acinetobacter* strains. *Apmis* 2002; **110**: 247-252.
10. **Ramirez MS, et al.** Increasing frequency of class 1 and 2 integrons in multidrug-resistant clones of *Acinetobacter baumannii* reveals the need for continuous molecular surveillance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011; **37**: 175-177.
11. **Martins AF, et al.** High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *American Journal of Infection Control* 2011; Jul 23.
12. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth information supplement M100-S17. CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.
13. **Woodford N, et al.** Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006; **27**: 351-353.
14. **Higgins PG, Lehmann M, Seifert H.** Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010; **35**: 305-305.

15. **Koeleman JGM, et al.** Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; **39**: 8-13.
16. **Segal H, Garry S, Elisha BG.** Is IS_{ABA-1} customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiology Letters* 2005; **243**: 425-429.
17. **Higgins PG, et al.** Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; **65**: 233-238.
18. **Corvec S, et al.** Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; **51**: 1530-1533.
19. **Mugnier PD, et al.** Worldwide Dissemination of the *bla*_{OXA-23} Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases* 2010; **16**: 35-40.
20. **Valenzuela JK, et al.** Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; **45**: 453-460.
21. **Partridge SR, et al.** Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiology Reviews* 2009; **33**: 757-784.
22. **Lee YT, et al.** Gene cassette arrays, antibiotic susceptibilities, and clinical characteristics of *Acinetobacter baumannii* bacteremic strains harboring class 1 integrons. *Journal of Microbiology Immunology and Infection* 2009; **42**: 210-219.

23. **Zhang JP, et al.** Molecular Characteristics and Resistant Mechanisms of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates in Shenyang, China. *The Journal of Microbiology* 2010; **28**: 689-694.
24. **Srinivasan VB, et al.** Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2009; **8**: 21.
25. **Fonseca EL, et al.** Class 2 integrons in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in different Brazilian geographic regions. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011; **38**: 95-96.
26. **Ramírez MS, et al.** Tn7::In2-8 dispersion in multidrug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* from Chile. *Revista Argentina de Microbiología* 2010; **42**: 138-140.
27. **Ploy MC, et al.** Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: Description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; **44**: 2684-2688.

Table 1. Distribution of carbapenems MICs according to the presence *ISAba1* and resistance genes among 58 *A.baumannii*

Genes ^a	n (%)	Antimicrobial Agent	MIC (µg/mL)					
			≤0.5	1-4	8	16	24	≥32
<i>bla</i>_{OXA-51-like} only	10 (17.2)	Imipenem	6	2	1	0	0	1
		Meropenem	3	5	0	1	0	1
<i>ISAba1/bla</i>_{OXA-51-like} only	8 (13.8)	Imipenem	7	1	0	0	0	0
		Meropenem	2	6	0	0	0	0
<i>bla</i>_{OXA-51-like} + <i>bla</i>_{OXA-23-like}	3 (5.3)	Imipenem	1	0	1	1	0	0
		Meropenem	2	0	0	0	0	1
<i>ISAba1/bla</i>_{OXA-51-like} + <i>bla</i>_{OXA-23-like}	1 (1.7)	Imipenem	0	0	0	1	0	0
		Meropenem	1	0	0	0	0	0
<i>ISAba1/bla</i>_{OXA-23-like} + <i>bla</i>_{OXA-51-like}	22 (37.9)	Imipenem	0	0	3	3	1	15
		Meropenem	0	0	1	1	0	20
<i>ISAba1/bla</i>_{OXA-23-like} + <i>ISAba1/bla</i>_{OXA-51-like}	14 (24.2)	Imipenem	0	1	2	3	0	8
		Meropenem	0	0	2	1	0	11

^a *bla*_{OXA-24-like}, *OXA-58-like*, *OXA-143* were not found

Table 2. Molecular characterization of resistance determinants

Profile (n)	<i>bla</i> _{OXA5}	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>	<i>ISAba1/OXA-23</i>	<i>ISAba1/OXA-51</i>
1 (5) ^a	51	-	-	-	-
2 (2) ^a	51	-	-	-	+
3 (4) ^{b1}	51	-	+	-	-
4 (5) ^a	51	-	+	-	+
5 (1) ^c	51	+	-	-	-
6 (1) ^c	51	+	+	-	+
7 (3) ^{b2}	23, 51	-	+	-	-
8 (1) ^c	23,51	-	+	-	+
9 (16) ^c	23,51	-	+	+	-
10 (7) ^c	23,51	-	+	+	+
11 (6) ^c	23,51	+	+	+	-
12 (7) ^c	23,51	+	+	+	+

^a All isolates of this profile were susceptible to carbapenems.

^{b1} Two susceptible isolates and 2 resistant isolates.

^{b2} One susceptible isolate and 2 resistant isolates.

^c All isolates of this profile were resistant to at least one carbapenem.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desde a década de 70, a disseminação de *Acinetobacter baumannii* multirresistente tem sido causa de diversas preocupações, principalmente no ambiente hospitalar. Infecções causadas por esse microrganismo são de difícil tratamento devido à sua alta taxa de resistência a maioria dos antimicrobianos, inclusive aos carbapenêmicos. Esse aumento da resistência aos carbapenêmicos pode ser explicado pela ação de carbapenemases e elementos genéticos móveis que sequências de inserção, que podem agir como sequências promotoras de oxacilinases.

O objetivo deste estudo foi analisar o papel do elemento *ISAb₁* associado aos genes *bla_{OXA-51-like}* e *bla_{OXA-23-like}* e sua contribuição para o aumento das MICs dos carbapenêmicos meropenem e imipenem, uma vez que, diversos estudos comprovam que esse elemento de inserção age como uma sequência promotor para a expressão dessas oxacilinases. Além disso, tínhamos como objetivo avaliar a prevalência de integrons de classe 1 e 2 nos isolados de *A. baumannii* testados.

Nossos resultados evidenciaram que o elemento *ISAb₁* *upstream* ao gene *bla_{OXA-23-like}* apresenta uma significativa ($p < 0,001$) associação com o aumento da MIC tanto do meropenem quanto do imipenem. Contudo, essa associação não foi evidenciada com o gene *bla_{OXA-51-like}*. Para conseguirmos elucidar melhor a real contribuição do elemento *ISAb₁* na expressão de oxacilinases, estudos com RT-PCR se fazem necessários para avaliar e quantificar os níveis de expressão desses genes.

Evidenciamos em nossos isolados uma prevalência de integrons de classe 2, dado que se diferencia de estudos realizados na Europa, Taiwan e Estados Unidos, onde integrons de classe 1 são historicamente descritos como prevalentes. Entretanto, essa alta frequência de integrons de classe 2 encontrados em nossos isolados ratifica dados já descritos em países da América Latina e até mesmo no Brasil. Com isso, acreditamos que nossos resultados contribuirão para uma melhor avaliação da distribuição

epidemiológica desses elementos. Além disso, acreditamos na necessidade da posterior caracterização dos cassetes gênicos contidos nesses integrons, permitindo uma melhor compreensão de sua contribuição para o desenvolvimento de resistência em *A. baumannii*.

É essencial que nós, quanto pesquisadores, obtenhamos o máximo de informações a respeito de mecanismos de resistência e sua disseminação, na tentativa de antever as diversas formas, tanto bioquímicas quanto genéticas na qual a bactéria pode desenvolver a resistência. Isso permitirá o desenvolvimento de estratégias racionais na tentativa de prolongar o tempo de efetividade de agentes antimicrobianos disponíveis no mercado, considerando que atualmente não existem relatos desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de infecções causados por *A. baumannii*.

TABELAS

Tabela 1. Mecanismos de resistência para diferentes classes de antimicrobianos em *A. baumannii**

Classe do antimicrobiano	Mecanismo de resistência	Proteínas	
β-Lactâmicos	β-lactamases	TEM -92, -116	
		SHV -12, -5	
		ADCs 1-7 ¹	
		VEB -1, -2	
		PER -1, -2	
		CTX-M -2, -3	
		OXA	
		IMP	
		VIM	
		SIM	
		KPC	
		GES -11	
		SCO -1	
		Perda de porinas	
HMP-AB ²			
33-36-kDa OMP			
43-kDa OMP			
22- and 33-kDa OMP			
OmpW 47-, 44-, and 37-kDa OMP			
Bomba de efluxo	AdeABC		
Aminoglicosídeos	Alteração em proteínas ligadoras de penicilina (PBPs)		
Aminoglicosídeos	Degradação enzimática	Acetiltransferases	
		Nucleotidiltransferases	
		Fosfotransferases	
	Bomba de efluxo		AdeABC
			AdeM
	16s rDNA metiltransferases		
Quinolonas	Modificação de sítio	GyrA, ParC	

	alvo	
	Bomba de efluxo	AdeABC AdeM
Tetraciclina e glicilciclina	Efluxo	Tet(A), Tet(B)
	Proteção ribossomal	Tet(M)
	Efluxo	AdeABC
Polimixinas	Mutação no sistema regulatório PmrAB	
Macrolídeos	Bomba de efluxo	AbeM AbeS

¹ ADCs, Acinetobacter-derived cephalosporinases; ² HMP-AB, heat-modifiable protein *Acinetobacter baumannii*

* Tabela adaptada de Peleg A. *et al.*, 2008 [1] e Gordon & Wareham, 2009 [137].

Tabela 2. β -lactamases identificadas em *A. baumannii**

Classificação de Bush-Jacobi-Medeiros	Classificação de Ambler	Enzima
1	C	AmpC
2b	A	TEM-1 e -2
2be	A	PER-1 e -2 VEB-1, -1a e -3 TEM-92 e -116 SHV-5 e -12 GES-11 CTX-M-2
2c	A	RTG-2, CARB-8 e RTG-4
2d	D	OXA-2, -20, -21 e -37 OXA-51-like OXA-23, -24/-40, -58, -143
2f	A	KPC-2, -3, -4,
3a	B	IMP-1, -2, -4, -6, -8, -11 VIM-1, -4, -11 SIM-1

* Adaptado de Zavascki *et al.*, 2010 [41].

Tabela 3. Genes de resistência identificados em cassetes gênicos *

Gene	Proteína	Tamanho do cassete gênico
Resistência a antibióticos β-lactâmicos		
<i>blaP1</i>	PSE-1/CARB-2	1044
<i>blaP2</i>	-	1044
<i>blaP3</i>	CARB-4	>1023
<i>blaIMP</i>	IMP-1	880
<i>blaESP</i>	ESP	880
<i>blaVEB-1</i>	VEB-1	1059
<i>oxa1</i>	OXA-1	1004
<i>oxa2a</i>	OXA-2	876
<i>oxa2b</i>	OXA-2B	876
<i>oxa3</i>	OXA-3	>861
<i>oxa5</i>	OXA-5	915
<i>oxa7</i>	OXA-7	874
<i>oxa9</i>	OXA-9	840
<i>oxa10</i>	OXA-10 (PSE-2)	920
<i>oxa15</i>	OXA-15	-
<i>oxa19</i>	OXA-19	-
<i>oxa20</i>	OXA-20	953
<i>oxa21</i>	OXA-21	-
Resistência a aminoglicosídeos		
<i>aadA1a</i>	AAD(3")	856
<i>aadA1b</i>	AAD(3")	856
<i>aadA2</i>	AAD(3")	856
<i>aadB</i>	AAD(2")	591
<i>aac(6b)-Ia</i>	AAC(6')-Ia	>778
<i>aac(6b)-Ib</i>	AAC(6')-Ib	637
<i>aac(6b)-Id</i>	AAC(6')-Id	526
<i>aac(6b)-II</i>	AAC(6')-II	720
<i>aac(6b)-Iq</i>	AAC(6')-Iq	712
<i>aacA7</i>	AAC(6')-I	591
<i>aac(6b)-IIa</i>	AAC(6')-IIa	628
<i>aac(6b)-IIb</i>	AAC(6')-IIb	653
<i>aac(3)-Ia</i>	AAC(3)-Ia	577
<i>aac(3)-Ib</i>	AAC(3)-Ib	>498
<i>aac(3)-VIa</i>	AAC(3)-VIa	-
Resistência ao trimetoprim		

<i>dfrA5</i>	DHFRV	568
<i>dfrA7</i>	DHFRVII	617
<i>dfrA12</i>	DHFRXII	584
<i>dfrA14</i>	DHFRIb	>523
-	DHFRXV	593
<i>dfrB1</i>	DHFRIIa	485
<i>dfrB2</i>	DHFRIIb	384
<i>dfrB3</i>	DHFRIIc	408
Resistência ao cloranfenicol		
<i>catB2</i>	CATB2	739
<i>catB3</i>	CATB3	739
<i>catB5</i>	CATB5	>677
<i>catB6</i>	CATB6	730
<i>cmIA</i>	CmIA	1549
<i>cmIA2</i>	CmIA2	-
<i>cmIB</i>	CmIB	-

*Adaptado de Fluit & Schmitz, 1999 [133].

FIGURAS

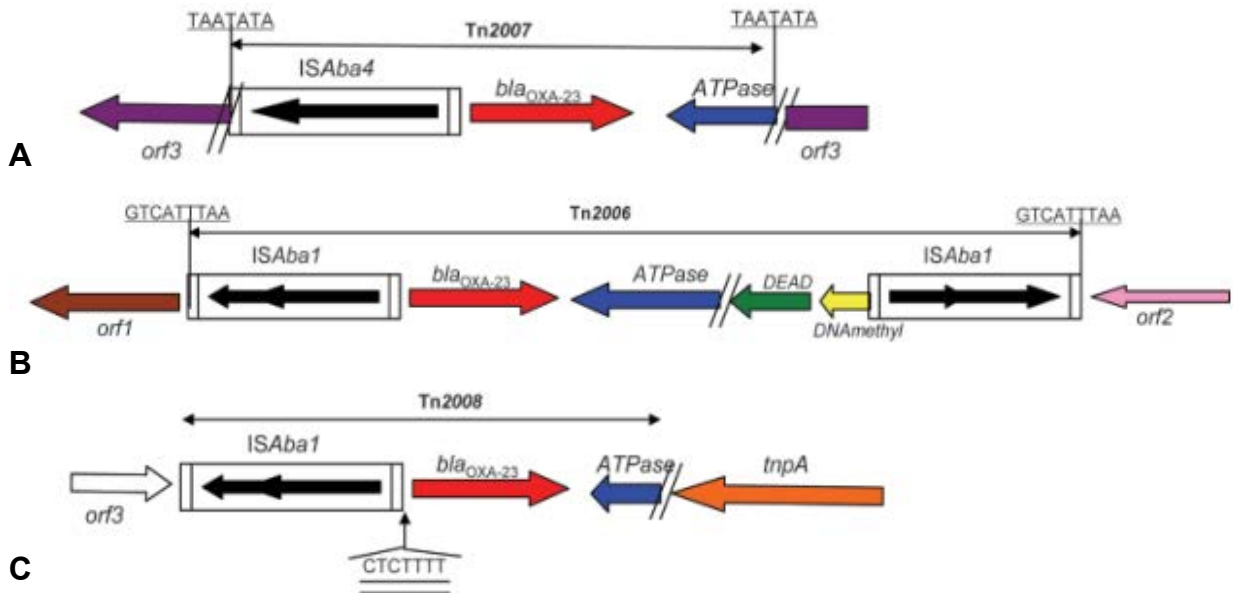


Figura 1. Representação esquemática de Tn2007, Tn2006 e Tn2008.* (A) Tn 2007 apresentando uma cópia do elemento *ISAbA4* upstream ao gene *bla_{OXA-23}* (B) Tn2006 contendo duas cópias do elemento *ISAbA1* flanqueando o gene *bla_{OXA-23}* (C) Tn2008 com apenas uma cópia do elemento *ISAbA1* upstream ao gene *bla_{OXA-23}*.

*Adaptado de Mugnier P.D. *et al.*, 2010 [75].

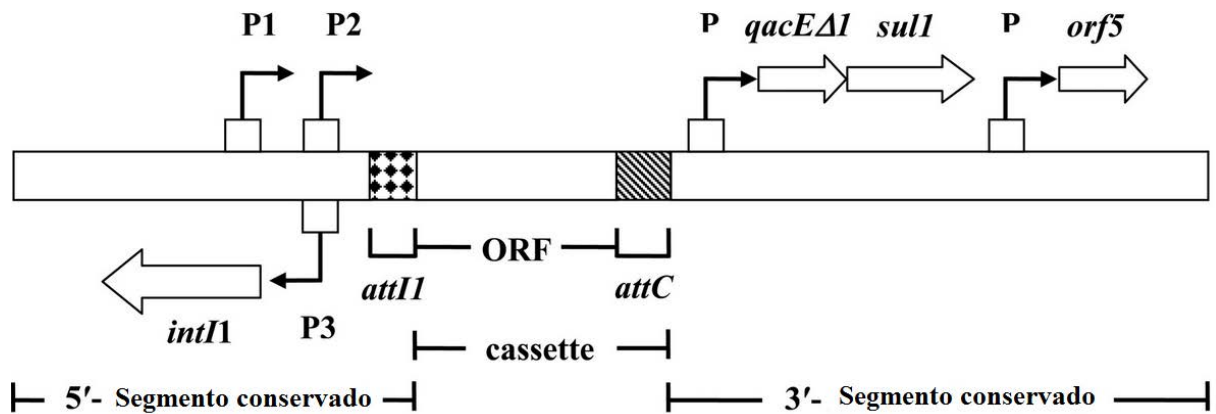


Figura 2. Representação simplificada de um integron de classe 1.* O gene *intI*, codifica uma recombinase sítio-específica, responsável pela captura do cassette gênico. P1, P2 e P3 são regiões promotoras responsáveis pela expressão dos genes contidos no cassette gênico. *attI* é sítio de reconhecimento para cassetes gênicos, onde o mesmo irá se inserir. *attC* é o sítio de recombinação do cassette gênico.

*Adaptado de Larouche & Roy, 2009 [138].