

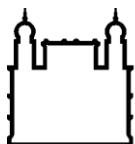
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

CARACTERIZAÇÃO DE *Acinetobacter* spp. MULTIRRESISTENTES
PRODUTORES DE CARBAPENEMASES, DOS TIPOS OXA E NDM,
ISOLADOS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

THIAGO PAVONI GOMES CHAGAS

Rio de Janeiro
Outubro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

THIAGO PAVONI GOMES CHAGAS

Caracterização de *Acinetobacter* spp. multirresistentes produtores de carbapenemases, dos tipos OXA e NDM, isolados de diferentes regiões do Brasil

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Medicina Tropical).

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marise Dutra Asensi

RIO DE JANEIRO

Outubro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

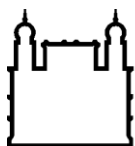
C433 Chagas, Thiago Pavoni Gomes

Caracterização de *Acinetobacter* spp. multirresistentes produtores de carbapenemases, dos tipos OXA e NDM, isolados de diferentes regiões do Brasil / Thiago Pavoni Gomes Chagas. – Rio de Janeiro, 2015.
xiii, 118 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.
Bibliografia: f. 70-104

1. *Acinetobacter* spp.. 2. Resistência aos antimicrobianos. 3. Carbapenemases. 4. OXA-23. 5. NDM. 6. PFGE. 7. MLST. I. Título.

CDD 616.92



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: THIAGO PAVONI GOMES CHAGAS

Caracterização de *Acinetobacter* spp. multirresistentes produtores de carbapenemases, dos tipos OXA e NDM, isolados de diferentes regiões do Brasil

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Marise Dutra Asensi

Aprovada em: 26/10/2015

REVISÃO: Prof^a Dr^a. Ana Paula D'Allincourt Carvalho Assef
Instituto Oswaldo Cruz (IOC - FIOCRUZ)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Cláudio Marcos Rocha de Souza (Presidente)
Instituto Oswaldo Cruz (IOC - FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos
Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC)

Prof^a. Dr^a. Cláudia Rezende Vieira de Mendonça Souza
Universidade Federal Fluminense (UFF)

Prof^a. Dr^a. Elizabeth de Andrade Marques
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Prof^a. Dr^a. Flávia Lúcia Piffano Costa Pellegrino
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO)

Suplentes:

Prof. Dr. José Procópio Senna
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos - FIOCRUZ)

Prof. Dr. Robson de Souza Leão
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Rio de Janeiro, 26 de Outubro de 2015.

À minha mãe Celma
E ao meu irmão Lucas

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, verdadeiro responsável por essa minha trilha até aqui.

Aos meus pais. Em especial, agradeço à minha mãe pelo apoio, paciência, e proteção em todas as etapas de minha vida.

Ao meu irmão Lucas pelo grande companheirismo e apoio.

A toda minha família, por acreditar em mim.

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, especialmente Ivson e Thamirys, pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos meus amigos que passaram pelo Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar ao longo desta trajetória.

À Dr^a. Marise Dutra Asensi, pela orientação.

Aos meus amigos e colegas da Medicina Tropical.

Aos professores da Pós-Graduação em Medicina Tropical, que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

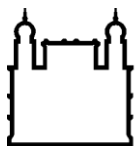
Aos secretários e demais funcionários da Secretaria Acadêmica, pela atenção.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Obrigado.

“Se as portas da percepção fossem
abertas, tudo apareceria ao homem tal
qual é, infinito”.
William Blake



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO DE *Acinetobacter* spp. MULTIRRESISTENTES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES, DOS TIPOS OXA E NDM, ISOLADOS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

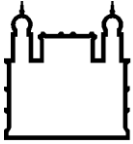
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Thiago Pavoni Gomes Chagas

Acinetobacter spp. é importante patógeno oportunista devido às suas associações às graves infecções em pacientes criticamente debilitados em diferentes regiões do mundo. No Brasil, *Acinetobacter* spp. tem sido, particularmente, problemático devido a sua prevalência e perfis de resistência aos antimicrobianos. A disseminação de *Acinetobacter* no ambiente hospitalar pode ser explicada por vários fatores, incluindo a resistência aos antibióticos, a capacidade de adaptação às condições ambientais desfavoráveis e a formação de biofilmes. O primeiro artigo avaliou os perfis de resistência e o polimorfismo genético de 155 isolados clínicos de *A.baumannii* provenientes de 11 estados brasileiros do período de 2008 a 2011. Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados através do método de disco difusão e *E-test*. A detecção dos genes $bla_{OXA-23-like}$, $bla_{OXA-24-like}$, $bla_{OXA-51-like}$, $bla_{OXA-58-like}$, $bla_{OXA-143-like}$, bla_{KPC} , bla_{NDM} e *ISAb1* foi feita através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). O polimorfismo genético e a relação de clonalidade dos isolados foram avaliados com auxílio de Eletroforese de Campo Pulsado em Gel de Agarose (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Taxas significativas de resistência foram observadas, especialmente, para os carbapenêmicos. O gene $bla_{OXA-51-like}$, intrínseco à espécie *A. baumannii*, foi detectado em todos os isolados e $bla_{OXA-23-like}$, foi positivo para 146 (94.2%). Os demais genes de carbapenemases não foram detectados. Na maioria dos isolados produtores de OXA-23, o gene $bla_{OXA-23-like}$ estava associado a *ISAb1*. Através do PFGE, os 146 isolados produtores de OXA-23 foram agrupados em 28 genótipos. Foi possível identificar 13 sequence types (ST) através do MLST. Os perfis do PFGE mais prevalentes foram designados como ST15 (CC15), ST1 (CC1) e ST79 (CC79). Os resultados revelaram a disseminação de dois grandes complexos clonais (CC15 e CC79) de *A. baumannii* produtores de OXA-23 em diferentes estados. No segundo artigo, o projeto de sequência do genoma de uma cepa *A. baumannii* multirresistente pertencente ao ST15/CC15 isolada em 2009 no Espírito Santo foi descrito. Observou-se, em um genoma com um tamanho estimado de 3.862 pb, genes que conferem resistência a beta-lactâmicos (bla_{OXA-51} , bla_{OXA-23} , bla_{TEM-1}), aos aminoglicosídeos (*aphA(6)* e *aac(3)-IIa*) e às sulfonamidas (*sul2*). No terceiro estudo, foi relatado *A. bereziniae* produtor de carbapenemase do tipo NDM isolado de um paciente internado em um hospital de Santa Catarina. PCR para genes das carbapenemases e o sequenciamento de DNA permitiu identificar a presença de bla_{NDM-1} . O gene foi localizado inserido em um transposon *Tn125* dentro de um plasmídeo de tamanho de 41 kb. Relatos de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos estão aumentando em todo o mundo e as carbapenemases do tipo OXA compreendem os principais mecanismos associados. Nesta perspectiva da resistência aos antimicrobianos, *Acinetobacter* spp. estabelece um grande desafio à terapia antimicrobiana e a disseminação dos seus genes de resistência parecem adquirir novas dinâmicas. A associação de um gene de carbapenemase e *A. bereziniae*, uma espécie que raramente é encontrada em amostras clínicas humanas, alerta para a emergência de espécies de *Acinetobacter* não-baumannii multirresistentes e sugere que estas podem servir como um reservatório para a transferência de determinantes genéticos de resistência.

Palavras-chave: *Acinetobacter* spp., resistência aos antimicrobianos, carbapenemases, OXA-23, NDM, PFGE, MLST.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CHARACTERIZATION OF MULTIDRUG-RESISTANT OXA- AND NDM-TYPE CARBAPENEMASE-PRODUCING *Acinetobacter* spp. ISOLATED FROM DIFFERENT BRAZILIAN REGIONS

ABSTRACT

PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Thiago Pavoni Gomes Chagas

Acinetobacter spp. is a Gram-negative bacilli recognized to be an opportunistic pathogen increasingly affecting severely ill patients around the world. In Brazil, *Acinetobacter* has become particularly problematic because of its prevalence and the profiles resistance. The ability to survive under a wide range of environmental conditions and to persist for extended periods of time on surfaces and develop antimicrobial resistance make it an important health care-associated pathogen. The first study investigated the resistance profiles and the genetic relationship of 155 *Acinetobacter baumannii* clinical isolated from inpatients during 2008 to 2011 from 11 Brazilian states. Antimicrobial susceptibility profile was determined by disc diffusion method and Etest. PCR (Polymerase chain reaction) was applied for carbapenemase genes (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}) and *ISAbal1*. Isolates were subjected to PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) and MLST (Multilocus Sequence Typing) for molecular typing. Most of the isolates showed high resistance rates to antibiotics tested, especially carbapenems. The *bla*_{OXA-51-like} gene was found in all isolates and 146 (94.2%) isolates were positive for *bla*_{OXA-23-like}. By additional screening, genes encoding for KPC and NDM were not found. In the most OXA-23-producing isolates the *bla*_{OXA-23-like} gene was accompanied by *ISAbal1*. A total of 146 OXA-23-producing isolates were clustered into twenty-eight genotypes by PFGE, while molecular analysis by MLST identified 13 sequence types (ST). The most prevalent PFGE profiles were designated as ST15 (CC15), ST1 (CC1) and ST79 (CC79). This study showed the widespread of clonal complexes (CC15 and CC79) of *A. baumannii* harbouring the *bla*_{OXA-23-like} gene in different Brazilian states. In the second study presented, the draft genome sequence of a multidrug-resistant *A. baumannii* (ST15/CC15) isolated in 2009 from Espírito Santo State (South-east, Brazil) was described. We observed important resistance determinant genes in an estimated genome size of 4.102.788 bp with 3.862 predicted coding regions. Our analyses revealed genes conferring resistance to beta-lactams (*bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23} and *bla*_{TEM-1}), to aminoglycosides (*aphA(6)* and *aac(3)-IIa*) and to sulphonamides (*sul2*). In the third study, the first description of NDM-producing *Acinetobacter bereziniae* in Brazil was reported. A Carbapenem-resistant *A. bereziniae* was recovered from a blood sample of a 21-year-old-man hospitalized patient admitted in a hospital from State of Santa Catarina, Southern Brazil. PCR screening for carbapenemase genes and DNA sequencing allowed us to identify the presence of *bla*_{NDM-1}. We observed *bla*_{NDM-1} gene in a ~41 kb plasmid and located inside a transposon *Tn125*. In the last years, carbapenem resistant *Acinetobacter* is increasing worldwide usually related to oxacilinas, mostly involving OXA-23 producers. *Acinetobacter* spp. has established a great challenge for antimicrobial therapy and its spread and its resistance genes seem to acquire novel dynamics. Here, we also showed an association of a carbapenemase gene (*bla*_{NDM}) with *Acinetobacter bereziniae*, a species which is rarely found in human clinical specimens. Emergence of multidrug resistant non-baumannii *Acinetobacter* suggests that this species may serve as a reservoir for transferring resistance encondig genes to other bacterial species.

Keywords: *Acinetobacter* spp., antimicrobial resistance, carbapenemases, OXA-23, NDM, PFGE, MLST.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de infecção primária da corrente sanguínea em UTIs do Brasil no período de 2013. 10
- Figura 1.2** Estrutura química das classes de beta-lactâmicos. 14
- Figura 1.3** Epidemiologia global de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos no mundo. 16
- Figura 1.4** Distribuição geográfica de NDM. 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Espécies atualmente nomeadas do gênero <i>Acinetobacter</i> .	6
Tabela 1.2	Principais grupos de antibióticos e seus respectivos mecanismos de ação.	13
Tabela 1.3	Resistência ao antimicrobianos em <i>Acinetobacter</i> spp.de acordo com estudos do SENTRY (1997-2010).	17
Tabela 1.4	Esquema de classificação das beta-lactamases	19
Tabela 1.5	Carbapenemases do tipo OXA e as espécies de <i>Acinetobacter</i> spp. associadas	27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Acb	Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>
ACT	<i>AmpC-type beta-lactamase</i>
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AL	Alagoas
AM	Amazonas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>
BA	Bahia
<i>bla</i>	beta-lactamase
BrSCOPE	<i>Brazilian Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance</i>
CARB	<i>Carbenicillin hydrolyzing beta-lactamase</i>
CC	<i>Clonal complex</i>
CCBH	Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMY	<i>Cephamicinase AmpC beta-lactamase</i>
CRAB	<i>Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii</i>
CTX-M	<i>Cefotaxime hydrolyzing capabilities beta lactamase</i>
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ES	Espírito Santo
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamases</i>
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GES	<i>Guiana extended-spectrum</i>
GO	Goiás
<i>gyrB</i>	<i>DNA gyrase subunit B gene</i>
IMP	<i>Imipenemase</i>
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPCS	Infecção Primária da Corrente Sanguínea

IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IS	<i>Insertion Sequence element</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LAPIH	Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
LPS	Lipopolissacarídeo
MBL	Metalo-beta-lactamase
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
MG	Minas Gerais
MLST	Multilocus sequence typing
MS	Mato Grosso do Sul
NaCl	Cloreto de sódio
NDM	<i>New Delhi Metallo-beta-lactamase</i>
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase
PAPES	Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde
PBP	Penicillin-Binding Protein
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PER	<i>Pseudomonas extended resistant beta-lactamase</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PNPCIRAS	Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
PSE	<i>Pseudomonas-specific enzyme beta lactamase</i>
RAST	Rapid Annotation using Subsystem Technology
<i>recA</i>	<i>Homologous recombination factor gene</i>
RJ	Rio de Janeiro
RN	Rio Grande do Norte
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
<i>rpoB</i>	<i>RNA polymerase subunit B gene</i>
SC	Santa Catarina

SCO	<i>Self-transferable plasmid from E. coli</i>
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
SHV	<i>Sulfhydryl variable beta lactamase</i>
SIM	<i>Seoul imipenemase</i>
ST	<i>Sequence type</i>
TEM	<i>Temoneira beta lactamase</i>
<i>Tn</i>	Transposon
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
VEB	<i>Vietnam extended-spectrum beta-lactamase</i>
VIM	<i>Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase</i>
WGS	<i>Whole Genome Shotgun</i>
<i>et al</i>	e outros
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (it is)
pb	pares de base
Kb	kilobase
®	marca registrada
µg	micrograma
µL	microlitro
n	número
pH	potencial hidrogeniônico
%	porcentagem
w/v	<i>weight/volume</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde	1
1.2	<i>Acinetobacter</i> spp.	4
1.2.1	Características gerais.....	4
1.2.2	Taxonomia e Identificação	5
1.2.3	Importância clínica	8
1.3	Antibióticos.....	12
1.3.1	Antibióticos beta-lactâmicos	13
1.4	Resistência aos antimicrobianos.....	15
1.4.1	Mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos	17
1.4.1.1	Beta-lactamases	18
1.5	Justificativa.....	31
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo Geral.....	32
2.2	Objetivos Específicos	32
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1	Caracterização de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos no Brasil (2008-2011): disseminação clonal dos complexos CC15 e CC79.....	34
3.2	Sequenciamento do genoma de uma cepa de <i>Acinetobacter baumannii</i> pertencente ao ST15 (complexo clonal CC15).....	50
3.3	Detecção de <i>Acinetobacter bereziniae</i> produtor de NDM no Brasil	55
3.4	Discussão geral	59
4	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
	ANEXO A- PERFIS DE RESISTÊNCIA E DO PFGE DOS 155 ISOLADOS DE <i>A. baumannii</i> (2008-2011).	105
	ANEXO B- ARTIGOS NA FORMATAÇÃO ORIGINAL	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) constituem um relevante problema de saúde pública em todo o mundo, sendo responsáveis pelo aumento no tempo de hospitalização e, conseqüentemente, elevados custos adicionais para o tratamento do doente. No Brasil, as IRAS têm sido motivo de preocupação entre os órgãos governamentais e, embora a regulamentação de medidas de controle tenha iniciado na década de 80, a problemática no país continua ainda sendo desafiadora (OLIVEIRA & MARUYAMA, 2008).

Por definição, as IRAS compreendem qualquer infecção adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, desde que esteja relacionada com a internação ou com os procedimentos realizados durante a internação. Além dos hospitais, as IRAS também podem estar relacionadas com procedimentos realizados em ambulatórios, consultórios e outras unidades de atendimento à saúde (BRASIL, 2013). Desde meados da década de 1990, o termo “infecções hospitalares” foi substituído por “infecções relacionadas à assistência em saúde” (IRAS), sendo essa designação uma ampliação conceitual que incorpora infecções adquiridas e relacionadas à assistência em qualquer ambiente (HORAN *et al.*, 2008).

Ao longo dos tempos, a assistência à saúde vem evoluindo com os avanços científicos e tecnológicos, refletindo-se em melhoria das ações de saúde para a população. Porém, se por um lado se observa o desenvolvimento científico-tecnológico, por outro, tem-se observado que problemas antigos ainda persistem como é o caso das IRAS (OLIVEIRA & MARUYAMA, 2008). Segundo alguns autores, os hospitais constituem instituições nas quais avanços científicos são utilizados para fornecer aos pacientes os serviços diagnósticos e terapêuticos mais atualizados. Porém, a aplicação de tecnologia não é isenta de riscos, estando as IRAS entre os mais antigos problemas dessas instituições (COUTO *et al.*, 2003; VERONESI & FOCCACIA, 2004).

Estima-se que, em países desenvolvidos, 5 a 10% dos pacientes admitidos em hospitais adquirem pelo menos uma IRA e, em países em desenvolvimento, essa taxa pode ser superior a 25% (ROCHA *et al.*, 2010). Os estudos de prevalência

realizados em alguns países em desenvolvimento reportaram taxas de infecção superiores a 15%, variando de 6% a 27% (FARIA *et al.*, 2007) O problema afeta, especialmente, pacientes críticos cujas taxas de infecção variam de 11 a 90 episódios por 1000 dias de internação em unidade de terapia intensiva (UTI) de adultos (ROSENTHAL *et al.*, 2006) e de 40 a 60 episódios por 1000 dias de internação entre neonatos (ABRAMCZYK *et al.*, 2003).

Dados do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), com base em registros de hospitais americanos, apontam que cerca de um em cada 25 pacientes internados tem pelo menos uma infecção associada aos cuidados de saúde. Estima-se que 722 mil casos de IRAS em hospitais americanos foram registrados em 2011, e cerca de 80 mil pacientes com IRAS morreram durante a hospitalização (MAGILL *et al.*, 2014). De acordo com European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC, 2015), cerca de 4.100.000 pacientes adquirem uma infecção nosocomial na Europa todos os anos e o número de mortes, que ocorrem como consequência direta destas infecções, é estimado em pelo menos 37.000. As infecções mais frequentes são as infecções do trato urinário, seguidas por infecções do trato respiratório, infecções após a cirurgia e infecções da corrente sanguínea. Ainda segundo o ECDC, cerca de 20 a 30% destas infecções são consideradas evitáveis por programas de higiene e de controle intensivo.

As IRAS são causa de grande preocupação das instituições de saúde do Brasil. Enquanto a média mundial de índice de infecção é 5%, o país apresenta o percentual de 15,5% entre os pacientes internados (ROCHA *et al.*, 2010). Até o presente momento, a única avaliação de âmbito nacional, no Brasil, é o estudo de Prade e colaboradores (1995), que, em 1994, investigou 99 hospitais terciários, apontando taxas de IRAS em torno de 15%. Em 2009, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) lançou um documento voltado para avaliar as situações de pacientes internados em UTIs no país, determinando a meta nacional de redução da Infecção Primária da Corrente Sanguínea (IPCS) associada ao cateter venoso central (BRASIL, 2009). Para atingir este objetivo, um sistema de vigilância foi iniciado, visando identificar a magnitude destas infecções, conhecer o seu perfil epidemiológico e oferecer resposta às ocorrências infecciosas (BRASIL, 2009). Os resultados desta vigilância epidemiológica são apresentados periodicamente no Boletim Informativo de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde (disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/>).

No último boletim da ANVISA (Ano IV, nº 08 de dezembro de 2014), em 2013, foi agrupado no banco de dados nacional um total de 13.356 notificações válidas de IRAS provenientes das UTIs de 1.256 hospitais brasileiros localizados nas 27 unidades da Federação. Foram notificadas 38.737 IPCS referentes ao período de janeiro a dezembro de 2013, sendo 21.957 (56,7%) em UTI adulto, 4.034 (10,4%) em UTI pediátrica e 12.746 (32,9%) em UTI neonatal. No geral, a proporção de IPCS notificadas com confirmação laboratorial foi de 62,3%. Tanto o número de hospitais que notificam como a quantidade de notificações que eles enviam vem aumentando desde 2011 segundo o boletim (BRASIL, 2014a).

Considerando as consequências e impactos das IRAS, pode-se destacar: os danos físicos e psicológicos ao paciente durante a hospitalização, sequelas funcionais, perda de órgãos vitais, perda da vida, danos pessoais e em familiares envolvidos, gastos da sociedade que poderiam ser alocados para outra atividade útil, processos legais e outros litígios, perda de credibilidade do pessoal da saúde e das instituições envolvidas, aumento do custo hospitalar, etc (COUTO *et al.*, 2003).

A partir da década de 1990, a IRAS passou a ser vista como um importante índice de qualidade da assistência médico-hospitalar. O serviço de prevenção destas infecções passou a ser considerado programa prioritário de garantia de qualidade na área de assistência médica. Além disso, nesta década, observou-se uma expansão da epidemiologia hospitalar através de ferramentas da epidemiologia molecular e da estatística (MARTINS, 2006). Diante da problemática das IRAS, a identificação, a prevenção e o controle dessas infecções compreendem fundamentos para a intervenção sobre o risco em serviços de saúde, antes que o dano alcance o paciente (JARDIM, 2011; BARBOSA, 2012).

A partir das orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS), a ANVISA instituiu, em setembro de 2013, o Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS). O objetivo geral do Programa é diminuir, em âmbito nacional, a incidência de IRAS, sendo os objetivos específicos: reduzir as IPCS; reduzir Infecções do Sítio Cirúrgico; estabelecer mecanismos de controle sobre a Resistência Microbiana em Serviços de Saúde; e aumentar o índice de conformidade do Programa, segundo os critérios da OMS (BRASIL, 2013). Oliveira e colaboradores (2009) apontam alguns desafios para a prevenção e controle das IRAS: a resistência bacteriana; o processamento de produtos para saúde; e o comportamento do profissional de saúde diante da adoção das recomendações do controle de infecção.

Entre o grupo de patógenos que causam IRAS, as bactérias são as que se destacam. Em 2008, Rice agrupou seis bactérias importantes no contexto destas infecções no chamado “ESKAPE bugs”, o qual inclui *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Este grupo tem como característica a capacidade de aquisição de diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos, dificultando a terapêutica antimicrobiana. A transmissão ao indivíduo dos patógenos envolvidos com as infecções ocorre tanto via exógena quanto pela via endógena (BRASIL, 2005). Na perspectiva das IRAS, estas estão intimamente associadas à resistência aos antimicrobianos, devido ao contato prolongado das bactérias com antimicrobianos no ambiente, favorecendo a seleção de cepas multirresistentes (LUNA, 2002; SANTOS, 2004).

1.2 *Acinetobacter* spp.

1.2.1 Características gerais

O gênero *Acinetobacter* spp. é formado por bactérias aeróbicas Gram-negativas pertencentes à família *Moraxellaceae*, não fermentadores de glicose, imóveis, não exigentes, catalase-positivos e oxidase-negativos. Não são capazes de produzir esporos e pigmentos; e não fixam nitrogênio (PELEG *et al.*, 2008; LIN & LAN, 2014; EUZÉBY, 2015). Certas cepas podem utilizar uma variedade de compostos orgânicos como fontes de carbono, tais como, hidrocarbonetos, ácidos alifáticos, açúcares pentoses, alcoóis, aminoácidos e componentes aromáticos. Não são capazes de utilizar glicerol, metanol, dissacarídeos, polissacarídeos e alcoóis poli-hídricos. Crescem em meio mineral como acetato como única fonte de carbono e utilizam amônia ou nitrato como fonte de nitrogênio (BAUMANN *et al.*, 1968). Com relação à morfologia colonial, na fase exponencial, as bactérias apresentam forma de bacilos, ocorrendo aos pares ou em cadeias de comprimento variável. Na fase estacionária, podem assumir a forma de cocobacilos ou formar filamentos. Esta morfologia cocobacilar em colorações de Gram é um indicativo inicial de que um isolado não fermentador pode pertencer ao gênero (MURRAY, 2007).

As espécies do gênero apresentam um bom crescimento em meios sólidos utilizados na rotina de laboratórios de microbiologia clínica. Algumas espécies, principalmente as de importância clínica, podem apresentar-se, em meios sólidos,

como colônias lisas, cremosas com coloração branca acinzentada. Algumas vezes, podem apresentar-se com aspecto mucóide e semelhanças com as colônias características da família *Enterobacteriaceae* (BERGOGNE-BÉRÉZIN & TOWER, 1996; PELEG *et al.*, 2008). No meio de cultura MacConkey, com exceção de algumas outras espécies, formam colônias de coloração rosa claro em razão da pouca oxidação da lactose (PAGEL & SEYFRIED, 1967; MURRAY, 2007).

Estas bactérias são saprofíticas com elevada versatilidade metabólica e nutricional e alta capacidade de adaptação em ambientes diversos e hostis. A capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono, a habilidade de crescer em diferentes condições de temperatura e pH, a resistência a desinfetantes, a tolerância a baixas taxas de umidade e a capacidade de aderir e formar biofilmes contribuem para a persistência deste microrganismo em diferentes ambientes incluindo, o hospitalar (JUNI, 1978; JAWAD *et al.*, 1998; WISPLINGHOFF *et al.*, 2007; PELEG *et al.*, 2008). Podem ser isolados do solo e da água, onde são amplamente distribuídos. Também são isolados de alimentos e podem fazer parte da flora normal de animais (BERGOGNE-BÉRÉZIN & TOWER, 1996; MISBAH *et al.*, 2005; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2008). Podem viver como comensais na pele, no trato gastrointestinal e outras zonas úmidas (virilha, axilas e espaços interdigitais) de indivíduos saudáveis (BERGOGNE-BÉRÉZIN & TOWER, 1996). *Acinetobacter* spp. também já foi isolado no corpo de piolhos em pessoas desabrigadas, em aquacultura de peixe, em fazendas de camarão e em águas residuais (LA SCOLA & RAOULT, 2004; HUYS *et al.*, 2007; CHAGAS *et al.*, 2011). No ambiente hospitalar, pode estar presente em locais úmidos (como pias, umidificadores e torneiras), equipamentos de ventilação, leitos, bancadas, e em outros diversos equipamentos médicos (MANIKAL *et al.*, 2000; BERNARDS *et al.*, 2004; DIJKSHOORN *et al.*, 2007). Nos últimos anos, tem sido associado a determinadas infecções, principalmente, em pacientes debilitados e internados em UTI (HIGGINS *et al.*, 2010).

1.2.2 Taxonomia e Identificação

A classificação do gênero tem uma história longa de mudanças e alterações na sua taxonomia. Inicialmente, o gênero *Acinetobacter*, por muito tempo, foi considerado como um representante da família *Neisseriaceae*, mas, atualmente, está inserido na família *Moraxellaceae*, ordem *Pseudomonadales*, classe *Gammaproteobacteria*, filo *Proteobacteria*. Sua história taxonômica foi iniciada no início do século XX. Em 1911, Beijerinck, cientista alemão, descobriu uma nova

espécie isolada do solo, nomeando-a *Micrococcus calcoaceticus*. No entanto, nos anos posteriores, novas bactérias com características semelhantes foram descritas e, então, classificadas em cerca de 15 espécies e gêneros diferentes (PELEG *et al.*, 2008). Em 1954, Brisou e Prévot reclassificaram o gênero, denominando-o como *Acinetobacter* (BERGOGNE-BÉRÉZIN & TOWER, 1996). Apenas em 1971, o gênero foi reconhecido, oficialmente, pelo Subcomitê em Taxonomia de *Moraxella* após a publicação do trabalho de Baumann e seus colaboradores (1968), que avaliaram as características bioquímicas das bactérias. Atualmente, mais de 40 espécies, entre aquelas com nomes definidos e os grupos de espécies genômicas, já foram descritas, sendo a maioria delas, microrganismos ambientais não associados às infecções em seres humanos (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Espécies atualmente nomeadas do gênero *Acinetobacter*

Nome da espécie	Referência
<i>Acinetobacter apis</i>	Kim <i>et al.</i> , 2014a
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Bouvet & Grimont, 1986
<i>Acinetobacter baylyi</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2009
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2010
<i>Acinetobacter bohemicus</i>	Krizova <i>et al.</i> , 2015
<i>Acinetobacter boissieri</i>	Álvarez-Pérez <i>et al.</i> , 2013
<i>Acinetobacter bouvetii</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter brisouii</i>	Anandham <i>et al.</i> , 2011
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Baumann <i>et al.</i> , 1968
<i>Acinetobacter gandensis</i>	Smet <i>et al.</i> , 2014
<i>Acinetobacter gernerii</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter grimontii</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter guangdongensis</i>	Feng <i>et al.</i> , 2014
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	Nemec <i>et al.</i> 2010
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	Nemec <i>et al.</i> 2009
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Bouvet & Grimont 1986
<i>Acinetobacter harbinensis</i>	Li <i>et al.</i> , 2014a
<i>Acinetobacter indicus</i>	Malhotra <i>et al.</i> , 2012
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Bouvet & Grimont 1986
<i>Acinetobacter junii</i>	Bouvet & Grimont 1986

Tabela 1.1 (Continuação)

Nome da espécie	Referência
<i>Acinetobacter kookii</i>	Choi <i>et al.</i> , 2013
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Brisou & Prévot 1954
<i>Acinetobacter nectaris</i>	Álvarez-Pérez <i>et al.</i> , 2013
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2011
<i>Acinetobacter pakistanensis</i>	Abbas <i>et al.</i> , 2014
<i>Acinetobacter parvus</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter pittii</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2011
<i>Acinetobacter puyangensis</i>	Li <i>et al.</i> , 2013
<i>Acinetobacter qingfengensis</i>	Li <i>et al.</i> , 2014b
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Nishimura <i>et al.</i> , 1988
<i>Acinetobacter rudis</i>	Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2011
<i>Acinetobacter schindleri</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2001
<i>Acinetobacter soli</i>	Kim <i>et al.</i> , 2008
<i>Acinetobacter tandoii</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter towneri</i>	Carr <i>et al.</i> , 2003
<i>Acinetobacter ursingii</i>	Nemec <i>et al.</i> , 2001
<i>Acinetobacter venetianus</i>	Vanechoutte <i>et al.</i> , 2009

O gênero *Acinetobacter* apresenta grande similaridade fenotípica entre suas espécies, principalmente as de importância clínica, o que limita a identificação laboratorial (BERGOGNE-BÉRÉZIN & TOWNER, 1996). A identificação, em nível de gênero, baseia-se nas propriedades fenotípicas, porém a identificação da espécie é bastante complexa. Especialmente, as espécies *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* são difíceis de serem separadas através de testes convencionais devido às suas similaridades fenotípicas e genotípicas, formando o complexo *A. calcoaceticus-A. baumannii* (Acb) (GERNER-SMIDT *et al.*, 1991).

Nos últimos anos, métodos moleculares vêm sendo propostos na tentativa de suprir as falhas na caracterização das espécies bacterianas (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; PELEG *et al.*, 2008; NEMEC *et al.*, 2011). Estes métodos moleculares incluem: (i) análise do perfil de restrição enzimática do gene 16S rRNA, como a técnica ARDRA (GARCÍA-ARATA *et al.*, 1997; DIJKSHOORN *et al.*, 1998); (ii) AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (JANSSEN *et al.*, 1997; DIJKSHOORN *et al.*, 1998; PELEG *et al.*, 2008); (iii) e na análise da sequência de um gene ou parte de uma região genética como, por exemplo, o gene codificador do RNA ribossômico

16S (IBRAHIM *et al.*, 1997), o espaço intergênico entre os codificadores do RNA ribossômico 16S e 23S (CHANG *et al.*, 2005), e os genes *recA*, *gyrB* e *rpoB* (KRAWCZYK *et al.*, 2002; YAMAMOTO & HARAYAMA, 1996; LA SCOLA *et al.*, 2006; HIGGINS *et al.*, 2010).

Recentemente, Wang e colaboradores (2014) avaliaram alguns métodos de identificação para encontrar uma abordagem conveniente para identificação de *Acinetobacter* spp. em nível de espécie. De acordo com os autores, como um método de identificação clássico, o sequenciamento do gene 16S rRNA foi altamente confiável em nível de gênero; no entanto, ele mostrou pouca capacidade discriminatória em nível de espécie. No caso do *rpoB*, a elevada variabilidade deste gene em *Acinetobacter* spp. pode ser considerada adequada para caracterização das espécies. Em 2014, Kamolvit e colaboradores desenvolveram e avaliaram um ensaio de PCR multiplex para detectar genes das oxacilinases, enzimas que hidrolisam antibióticos beta-lactâmicos, intrínsecas em algumas espécies, como um método potencial para identificação de *Acinetobacter* spp.

1.2.3 Importância clínica

Espécies de *Acinetobacter* se destacam como significativos patógenos oportunistas. No ambiente hospitalar, *Acinetobacter* têm sido associados a uma grande variedade de infecções, especialmente, em pacientes criticamente debilitados com seus sistemas de defesa comprometidos. Estas infecções incluem pneumonia, infecções da pele e dos tecidos moles, infecções de feridas, infecções do trato urinário, meningite e infecções da corrente sanguínea. Infecções hospitalares e surtos hospitalares têm sido atribuídos, principalmente, à espécie *A. baumannii* e, em menor grau, também associadas às espécies *A. nosocomialis* e *A. pittii*. Infecções hospitalares causadas por outras espécies como *A. bereziniae*, *A. guillouiae*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. parvus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri*, *A. soli* e *A. ursingii* são raras e estão restritas, principalmente, às infecções da corrente sanguínea relacionadas ao cateter (VISCA *et al.*, 2011).

Acinetobacter spp., ocasionalmente, já foi notificado como agente de infecções adquiridas na comunidade, tais como infecção de feridas, infecção do trato urinário, otite média, infecções oculares, meningite e endocardite. No entanto, a identificação em nível de espécie não foi realizada com métodos de referência na maioria desses relatórios, deixando dúvidas sobre as espécies exatas envolvidas.

Além disso, com exceção de *A. baumannii* e suas espécies próximas, as bactérias do gênero são comensais normais, colonizando pele e membranas mucosas dos seres humanos; e o seu isolamento pode ter sido mal interpretado como indicativo de agentes causadores de infecção. Ainda no contexto das infecções comunitárias, *A. baumannii* é reconhecido como uma causa rara de pneumonia adquirida na comunidade grave nas zonas tropicais da Ásia e Austrália. Esses pacientes, geralmente, tinham doença grave subjacente, tal como doença pulmonar obstrutiva crônica, *diabetes mellitus* ou histórico de consumo excessivo de álcool ou tabagismo intenso. Esses casos, muitas vezes, possuem um curso clínico fulminante com uma alta incidência de bacteremia e uma alta taxa de mortalidade, variando entre 40 e 64% (VISCA *et al.*, 2011).

Com relação ao ambiente hospitalar, bactérias do gênero *Acinetobacter* tornaram-se uma preocupação devido à sua capacidade de causar surtos e infecções nosocomiais. Devido aos seus mecanismos que facilitam a colonização de pacientes e/ou dispositivos utilizados em ambientes hospitalares, infecções relacionadas a dispositivos médicos são clinicamente importantes. Entre as espécies bacterianas do gênero, *A. baumannii* é cada vez mais frequentemente responsável por pneumonia nosocomial em UTI, pneumonia predominantemente associada à ventilação mecânica, cuja incidência aumentou de 4% (1986) para 7% (2003) em unidades de saúde norte-americanas. Enquanto que, as infecções da corrente sanguínea por *A. baumannii* saltaram de 1% para 2% entre todas as infecções da corrente sanguínea (KIM *et al.*, 2014b). A taxa de mortalidade para casos de bacteremias, por exemplo, por *Acinetobacter* spp. é significativamente maior comparada com os casos envolvendo outros patógenos Gram-negativos, incluindo *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (GKRANIA-KLOTSAS & HERSHOW, 2006; ROBENSHTOK *et al.*, 2006).

Vincent e colaboradores (2009), em um estudo internacional de prevalência e surto de infecções em UTI (*Extended Prevalence of Infection in Intensive Care study*), avaliaram 13.796 pacientes internados em 75 países dos cinco continentes; E, entre os 7.087 pacientes infectados, *Acinetobacter* spp. estava associado à 8.8% das síndromes infecciosas que acometeram os pacientes (VINCENT *et al.*, 2009). Dados de *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS) mostraram que, no período entre 1975 e 2003, houve um aumento de 1.5% para 6.9% das pneumonias hospitalares causadas por *Acinetobacter* spp., 1.8% para 2.4% das infecções de corrente sanguínea, 0.5% para 2.1% das infecções de

sítio cirúrgico e um aumento de 0.6% para 1.6% das infecções do trato urinário (SLAMA, 2008). Já entre os anos 2009 e 2010, segundo o NNIS, *Acinetobacter* spp. representava 2.1% dos patógenos associados às infecções de corrente sanguínea, 0.9% em infecções urinárias associadas ao cateter, 6.6% em pneumonias hospitalares e 0.6% dos patógenos envolvidos em infecções de sítio cirúrgico em hospitais americanos (SIEVERT *et al.*, 2013).

No Brasil, segundo o relatório do Boletim Informativo Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 9, Ano V, da ANVISA (BRASIL, 2014b), entre as 18.233 infecções de corrente sanguínea primária associadas ao cateter venoso central notificadas em UTI adulto, pediátrica e neonatal, no período entre janeiro e dezembro de 2013, *Acinetobacter* spp. encontrava-se entre os principais patógenos associados (Figura 1.1).

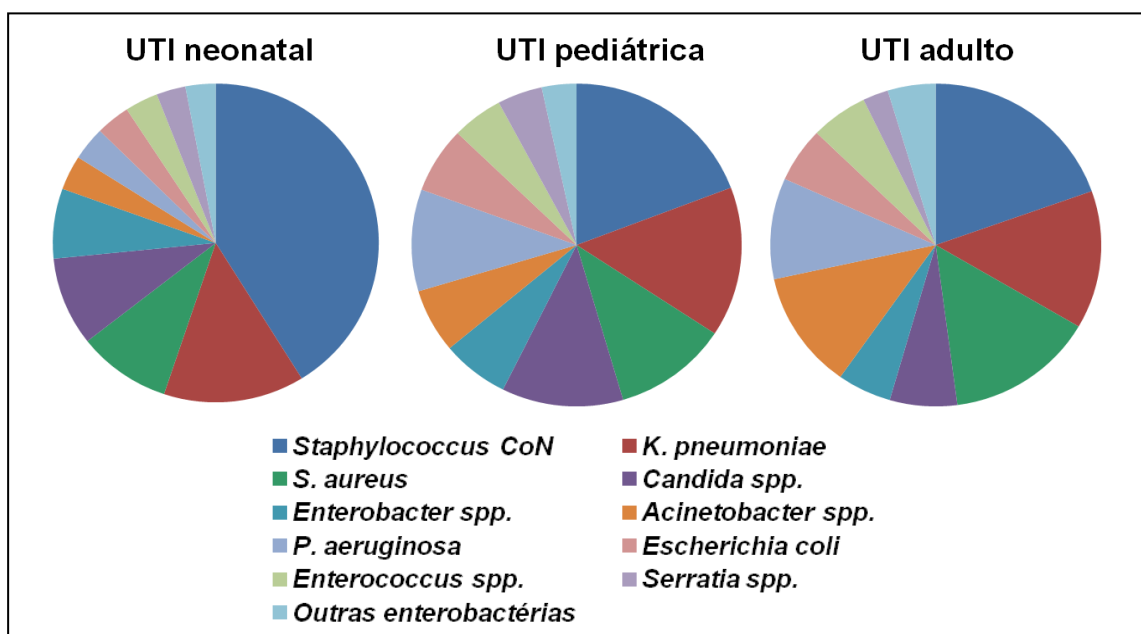


Figura 1.1 Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de infecção primária da corrente sanguínea em UTIs do Brasil no período de 2013 (Fonte: BRASIL, 2014b).

As infecções por *Acinetobacter* spp. são influenciadas por vários fatores de risco como o uso de dispositivos médicos e exposição a antibióticos de largo espectro, o tipo de unidade onde o paciente é admitido e o tempo de internação. A soma destes fatores pode contribuir para surtos que são de difícil controle (FONTANA *et al.*, 2008). Além disso, pacientes multi-invadidos em uso de cateter venoso central, sonda vesical, ventilação mecânica e que realizaram algum procedimento cirúrgico são os mais suscetíveis (WANG *et al.*, 2003; VAN DEN BROEK *et al.*, 2006; BARAN *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2008).

O rápido surgimento e a disseminação global de *Acinetobacter* demonstra a boa adaptação destas bactérias ao ambiente hospitalar (GORDON & WAREHAM, 2010). O surgimento das infecções por estes patógenos é favorecido pela grande capacidade de adaptação às condições ambientais desfavoráveis, a utilização de uma variedade de fontes nutricionais, a adaptação às diferentes temperaturas, condições de salinidade e níveis de umidade (BERGOGNE & TOWNER, 1996). O impacto clínico das infecções é percebido já que os pacientes ficam mais tempo hospitalizados, submetidos à terapia antimicrobiana de amplo espectro e, muitas vezes, em unidades de isolamento (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2008). O aumento no tempo de internação pode estar associado ao sítio de infecção e ao perfil de susceptibilidade do microrganismo (MARAGAKIS & PERL, 2008).

Acinetobacter foi, inicialmente, considerado como um organismo de baixa virulência, e pouco se sabe sobre seus mecanismos de virulência e respostas ao hospedeiro. Vários mecanismos específicos relacionados com a capacidade da bactéria em aderir, colonizar e invadir as células epiteliais humanas, já foram identificados. Algumas características que podem favorecer a virulência destas bactérias incluem: propriedade de adesão a células epiteliais humanas através de fímbrias; produção de lipopolissacarídeos (LPS); cápsula polissacarídica, citotóxica para células fagocíticas; produção de enzimas hidrolíticas responsáveis por danos aos tecidos lipídicos durante o processo de invasão; e produção de sideróforos que permitem a captação de íons necessários para a sobrevivência do microrganismo (BERGOGNE-BEREZIN & TOWNER, 1996; KIM *et al.*, 2014b). A formação de biofilme pode ser também considerada um fator de virulência importante para muitos isolados, principalmente, *A. baumannii* (KIM *et al.*, 2014b). Estas estruturas denominadas biofilmes compreendem comunidades multicelulares tridimensionais, onde as células são envolvidas em uma matriz composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (CHOI *et al.*, 2008). Isso permite que *Acinetobacter* spp. possa colonizar e persistir em superfícies bióticas e abióticas. (KIM *et al.*, 2014b). A formação de biofilmes está associada à contaminação de equipamentos hospitalares (respiradores, ar condicionado, equipamentos para diagnóstico por imagem, etc.) (GIAMARELLOU *et al.*, 2008; MARTINS & BARTH, 2013).

1.3 Antibióticos

Ao longo da história, observa-se a ocorrência de uma batalha contínua entre os seres humanos e os microrganismos com poder de causar infecções. No século XX, ocorreu uma transformação da forma de entender e tratar as enfermidades infecciosas. O grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928. A atividade da penicilina era superior à das sulfas e a demonstração que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antibióticos: a prospecção em culturas de microrganismos, especialmente fungos e bactérias (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

A definição clássica de um antibiótico é um composto produzido por um microrganismo que destrói ou inibe o crescimento de outro microrganismo. Ao longo dos anos, essa definição foi ampliada para incluir os produtos sintéticos e semissintéticos. Neste trabalho e em muitos outros estudos, os termos antibióticos e antimicrobianos são tratados como sinônimos. As drogas antimicrobianas podem ser bactericidas, ou seja, matam os microrganismos; ou bacteriostáticas, impedindo o crescimento. A ação dos antibióticos é direcionada a alvos particulares nos microrganismos, destacando-se: a inibição da síntese da parede celular, a inibição da síntese protéica, a inibição de ácidos nucleicos e a alteração da permeabilidade celular (TORTORA *et al.*, 2005).

Os antibióticos podem ser classificados de diversas formas, sendo a mais comum a classificação de acordo com a ação contra o organismo infectante. Podem ser classificados também de acordo com a estrutura química, a síntese, o efeito no microrganismo e o espectro de ação. Este espectro de ação refere-se à diversidade de organismos afetados pelo agente e com base nisso, geralmente, o antibiótico pode ter largo (atuando contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, por exemplo), intermediário e baixo (com atividade restrita a um grupo de bactérias) espectro de ação (GUARDABASSI *et al.*, 1998; TRABULSI *et al.*, 1999). A toxicidade seletiva destes agentes quimioterápicos baseia-se nas diferenças de estrutura e composição química entre as células procarióticas (TORTORA *et al.*, 2005).

Os antibióticos compõem um grupo diversificado de produtos químicos que pode ser dividido em diferentes subgrupos, como beta-lactâmicos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas e outros. Na Tabela 1.2, estão listados os principais grupos de antibióticos e seus mecanismos de ação.

Tabela 1.2 Principais grupos de antibióticos e seus respectivos mecanismos de ação

Classe	Mecanismo de ação
Beta-lactâmicos (ex.: cefalotina, cefotaxima, cefepime, ceftazidima)	Inibem a síntese da parede celular, fixando-se às proteínas fixadoras de penicilinas, impedindo a produção de peptidoglicano.
Cloranfenicol	Inibe a síntese protéica, fixando-se à subunidade ribossomal 30S.
Aminoglicosídeos (ex.: amicacina, gentamicina, estreptomicina)	Inibem a síntese protéica, fixando-se à subunidade ribossomal 30S.
Quinolonas (ex.: ciprofloxacina, norfloxacina)	Inibem a síntese de DNA, fixando-se às enzimas DNA-girases.
Glicopeptídeos (vancomicina)	Inibe a síntese da parede celular.
Macrolídeos, Lincosamidas e Streptogramina	Inibem a síntese protéica, fixando-se à subunidade ribossomal 30S.
Nitrofurantoína	Atuação sobre o DNA. O mecanismo exato ainda não está esclarecido.
Polimixinas (ex.: polimixina B, colistina)	Rompem a membrana celular.
Rifampicina	Fixa-se às RNA-polimerases, inibindo a síntese de RNA.
Sulfonamidas	Atuam sobre a via do ácido fólico, fixando-se à enzima diidropterato-sintetase.
Tetraciclina	Inibem a síntese protéica, fixando-se à subunidade ribossomal 30S.
Trimetoprim	Atuam sobre a via do ácido fólico, fixando-se à enzima diidropterato-sintetase.

Fonte: Forbes *et al.*, 1998; Koneman *et al.*, 2001.

1.3.1 Antibióticos beta-lactâmicos

Os compostos beta-lactâmicos compreendem o maior grupo de drogas antimicrobianas, geralmente, com ação bactericida. A base da estrutura molecular destes compostos é o anel beta-lactâmico, que é uma amida cíclica, com estrutura

heteroatômica, consistindo de três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio (TIDWELL, 2007). O anel beta-lactâmico é a chave para o mecanismo de ação na parede celular através da ligação às enzimas PBPs (*Penicillin-binding proteins*), inativando este conjunto de transpeptidases que catalisam as ligações cruzadas na fase final da síntese do peptidoglicano, principal componente da parede celular bacteriana (DRAWZ & BONOMO, 2010).

Os beta-lactâmicos possuem baixa toxicidade, pois atuam na parede celular, estrutura inexistente em células eucariotas, sendo, portanto, utilizados para o tratamento de um grande número de infecções (DRAWZ & BONOMO, 2010). Existem quatro classes de beta-lactâmicos disponíveis comercialmente: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Figura 1.2). Dentro de cada grupo, pequenas alterações na estrutura química são capazes de modificar as características dos antibióticos, como: espectro de ação, afinidade por receptores e resistência (SUAREZ & GUDIOL, 2009).

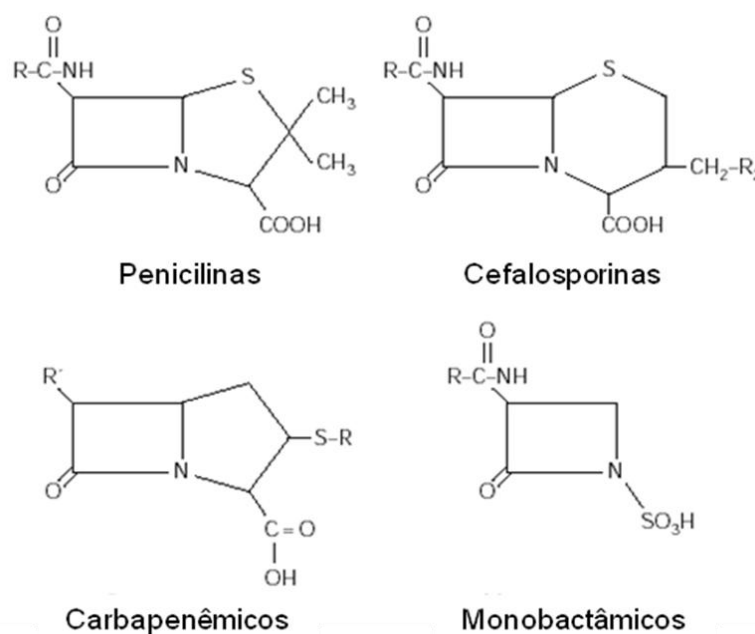


Figura 1.2 Estrutura química das classes de beta-lactâmicos.

No contexto dos antibióticos, um dos problemas emergentes na medicina é o uso inadequado destas drogas. O uso indiscriminado de antibióticos, terapêutica ou profilaticamente, tem favorecido a pressão seletiva, mostrando como resultado a seleção e predominância de espécies bacterianas com diferentes perfis de resistência. A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno natural, mas se converte em um problema preocupante, quando é acelerada pela utilização incorreta de drogas e descuido humano (OMS, 2010). Estimativas da OMS indicam que,

possivelmente, metade do consumo total de antibióticos é desnecessária (OMS, 2005).

1.4 Resistências aos antimicrobianos

Segundo Madigan e colaboradores (2004), a resistência às drogas antimicrobianas corresponde à capacidade de um organismo de resistir a um agente quimioterápico ao qual este é, normalmente, sensível. A resistência a antimicrobianos apresentada pelas bactérias ocorre devido às características codificadas geneticamente, podendo ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela resultante da genética, estrutura e fisiologia natural do microrganismo. Já a resistência adquirida resulta da alteração da estrutura e fisiologia celular através de mutação genética, transferência de genes de outros organismos, ou ainda de uma associação de ambas (FORBES *et al.*, 1998; DZIDIC & BEDEKOVIC, 2003).

As células bacterianas apresentam algumas estratégias para impedir a ação dos agentes antimicrobianos, tais como: alteração da proteína alvo, inativação enzimática, alteração da permeabilidade da membrana e mecanismo de efluxo. A alteração da permeabilidade da membrana corresponde à alteração dos canais de porinas, modificando a penetração e, conseqüentemente, a ação dos diferentes antibióticos. A alteração da proteína alvo está associada à alteração do sítio específico de ligação dos antibióticos na bactéria, diminuindo assim a afinidade da droga pelo sítio e, conseqüentemente, a atividade da droga. Quanto à inativação enzimática, bactérias podem produzir enzimas como, por exemplo, as beta-lactamases, as quais neutralizam as drogas e seus efeitos antibióticos. Outro mecanismo é o de efluxo ou bomba de efluxo que corresponde à propriedade de expulsar ativamente os antibióticos para fora da célula, promovendo uma ação não efetiva do antimicrobiano (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Desde o início de 1970, isolados de *Acinetobacter* spp. tem progressivamente acumulado resistência, principalmente, aos beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos (COELHO *et al.*, 2004). O surgimento de cepas de *Acinetobacter* resistentes a muitas classes de antibióticos tem sido atribuído a sua rápida capacidade para acumular mecanismos de resistência bem como sua plasticidade para transferência genética. Portanto, *Acinetobacter* pertence a uma classe única de bactérias Gram-negativas que são caracterizadas como "naturalmente

transformáveis” (GIAMARELLOU *et al.*, 2008). Atualmente, estes microrganismos tem atraído atenção devido ao aumento das taxas da resistência, principalmente, na América Latina. E existe uma preocupação especial quanto aos carbapenêmicos, especialmente, imipenem e meropenem, que foram introduzidos em 1985 e, por anos, foram os agentes mais importantes para o tratamento de infecções causadas por cepas multirresistentes, porém suas taxas de suscetibilidades vêm declinando de forma considerável (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; MARRA *et al.*, 2011). Alguns recentes trabalhos destacam que, em certas regiões do mundo, as taxas de resistência aos carbapenêmicos superam 50% (Figura 1.3) (BAE *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2014b).

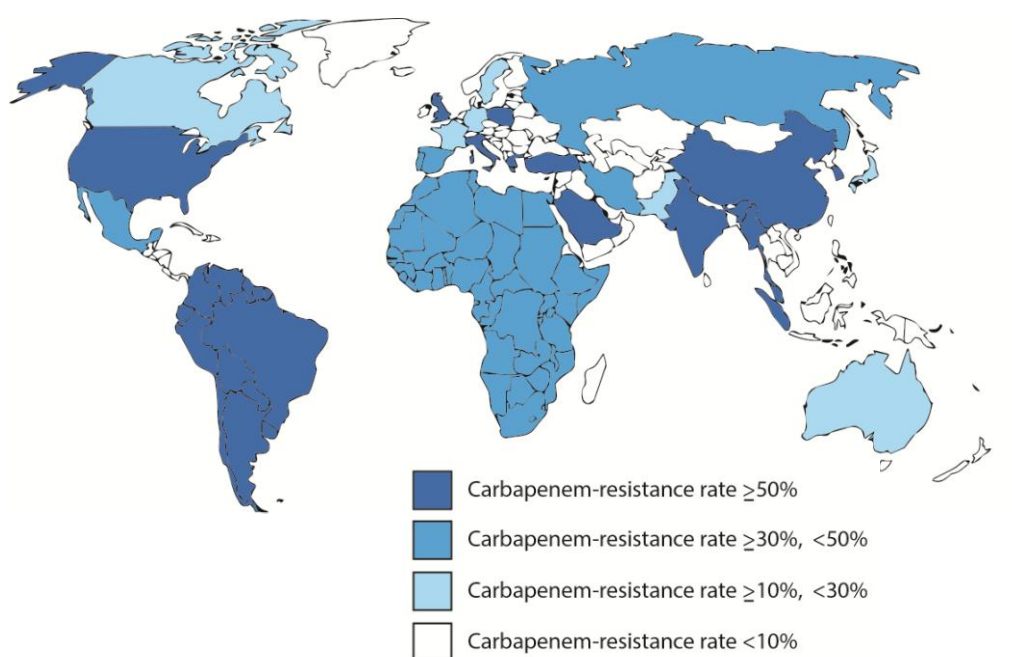


Figura 1.3 Epidemiologia global de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos no mundo (Fonte: KIM *et al.*, 2014).

De acordo com os dados do SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), taxas de resistência ao imipenem, principalmente, na América Latina, aumentaram de 9.9% para 71.4% entre 1997 e 2010 (Tabela 1.3) (GALES *et al.*, 2001; GALES *et al.*, 2011; GALES *et al.*, 2012). No período de 2007 a 2010, levantamentos do BrSCOPE (*Brazilian Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*) indicaram que, entre 16 hospitais de diferentes regiões geográficas do país, cefalosporinas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos não foram eficazes contra mais de 50% das cepas de *Acinetobacter* spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea. As taxas de resistência para o imipenem e meropenem foram 55.9% e 56.4% respectivamente (MARRA *et al.*, 2011).

Tabela 1.3 Resistência ao antimicrobianos em *Acinetobacter* spp. de acordo com estudos do SENTRY (1997-2010).

Antimicrobiano	% isolados resistentes / período do estudo			
	SENTRY 1997-1999	SENTRY 2001-2004	SENTRY 2006-2009	SENTRY 2008-2010
Imipenem	9.9	13.6	40.3	67.8
Meropenem	9.7	16.4	ND	66.1
Ceftazidima	63.6	67.6	57.6	81.7
Cefepime	43.8	63.6	55.1	76.6
Gentamicina	60.6	ND	ND	53.3
Amicacina	62.5	59.6	51.4	62.6
Ciprofloxacina	69.9	65.2	66.9	87.2

Fonte: GALES *et al.*, 2001; GALES *et al.*, 2006; GALES *et al.*, 2011; GALES *et al.*, 2012.

Atualmente, cepas de *Acinetobacter* são altamente resistentes para a maioria dos antibióticos disponíveis na prática clínica. Diferentes mecanismos de resistência a muitas classes de antibióticos são conhecidos, incluindo produção de enzimas inativadoras, bombas de efluxo, alteração da permeabilidade da membrana e a alteração dos sítios-alvo. A maioria destes mecanismos de resistência pode ter como alvo diferentes classes de antibióticos. Contudo, vários mecanismos diferentes podem trabalhar juntos para contribuir para a resistência a uma única classe de drogas (GORDON & WAREHAM, 2010; ROCA *et al.*, 2012).

1.4.1 Mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos

Na perspectiva da resistência aos antimicrobianos, os beta-lactâmicos, especialmente, os carbapenêmicos, compreendem um importante grupo de antibióticos utilizados no tratamento de infecções por *Acinetobacter* spp. e, assim, os mecanismos de resistência a este grupo passam a ter uma grande relevância. Em *Acinetobacter* spp., os mecanismos de resistência descritos para estas drogas incluem: (i) a hidrólise por beta-lactamases; (ii) alterações na proteínas de membrana externa (porinas) e proteínas de ligação à penicilina (PBPs); e (iii) hiperexpressão dos sistemas de efluxo (VAN LOOVEREN *et al.*, 2004; POIREL & NORDMANN, 2006; PEREZ *et al.*, 2007; VILA *et al.*, 2007).

1.4.1.1 *Beta-lactamases*

As beta-lactamases são enzimas que inativam os antibióticos beta-lactâmicos, atuando como um dos principais mecanismos associados a resistência a este grupo extremamente relevante de agentes antibacterianos (BUSH 2013). Estas enzimas clivam o anel beta-lactâmico, alterando assim a estrutura do antimicrobiano, que não consegue se ligar efetivamente às PBPs, o que permite que a síntese da parede celular bacteriana continue normalmente (FORBES *et al.*, 1998). O número de beta-lactamases descritas, atualmente, excede 1.300, tornando um dos grupos de enzimas mais numerosos que tem sido estudado em detalhes. O impacto clínico destas enzimas é, particularmente, crítico por causa da dependência de beta-lactâmicos para o tratamento das infecções bacterianas (BUSH, 2013).

Devido ao crescente número de beta-lactamases identificadas e à diversidade de características bioquímicas e moleculares, diferentes esquemas de classificação foram propostos ao longo dos anos. A primeira classificação foi proposta por Ambler, em 1980, agrupando-as em quatro classes moleculares: serino beta-lactamases, metalo-beta-lactamases, cefalosporinases cromossomais, e oxacilinasas, baseadas nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos das enzimas (AMBLER, 1980). Em 1989, Bush agrupou as enzimas em quatro grupos definidos de acordo com o substrato e os perfis de inibição (BUSH, 1989a; BUSH, 1989b). Após este período, atualizações foram inseridas na classificação, como a proposta em 1995 por Bush e colaboradores (BUSH *et al.*, 1995) e, em 2001, novamente, por Bush, que adaptou a classificação anterior às formas de aquisição dos genes das beta-lactamases (BUSH, 2001). Em 2010, Bush e Jacoby propuseram uma nova classificação (Tabela 1.4), incluindo novos subgrupos, baseada nas características funcionais da enzima, onde foram divididas em três grupos (1, 2 e 3) e subdivididas de acordo com seu espectro de ação e inativação pelos inibidores, mantendo uma correlação com a classificação de Ambler (BUSH & JACOBY, 2010).

Tabela 1.4 Esquema de classificação das beta-lactamases

Grupo Bush & Jacob 2009	Classe Molecular	Substrato principal	Características principais	Principais representantes
1	C	Cefalosporinas	Hidrolisa melhor cefalosporinas que benzilpenicilinas; hidrolisa também as cefamicinas. Não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam e EDTA.	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1.
1e	C	Cefalosporinas	Aumento na hidrólise de ceftazidimas, e outros oximino beta-lactâmicos. Não são inibidas pelo por ácido clavulânico, tazobactam e EDTA.	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Hidrolisa melhor benzilpenicilina do que cefalosporinas Inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam.	PC1
2b	A	Penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração	Hidrólise similar de benzilpenicilina e cefalosporinas. Inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam.	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	Aumento na hidrólise oximino-beta-lactâmicos, tais como cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima e aztreonam. Inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam.	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	Resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	Aumento na hidrólise de oximino-beta-lactâmicos combinado com a resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	Aumento da hidrólise de carbenicilina. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	PSE-1, CARB-3

Tabela 1.4 Continuação

Grupo Bush & Jacob 2009	Classe Molecular	Substrato principal	Características principais	Principais representantes
2ce	A	Carbenicilina e cefepime	Aumento da hidrólise de carbenicilina e cefepime. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Aumento da hidrólise de cloxacilina ou oxacilina. Inibidas por ácido clavulânico.	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de amplo espectro	Hidrólise cloxacilina ou oxacilina e oximino-betalactâmicos. Inibição variável pelo ácido clavulânico ou tazobactam.	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenêmicos	Hidrólise cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos. Inibição variável pelo ácido clavulânico ou tazobactam.	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de amplo espectro	Hidrolisa cefalosporinas. Inibida pelo ácido clavulânico, mas não aztreonam.	CepA
2f	A	Carbapenêmicos	Enzimas que hidrolisam carbapenemas e possuem uma serina no seu sítio ativo. Tais enzimas são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B1	Carbapenêmicos	Hidrólise de beta-lactâmicos de amplo espectro e carbapenêmicos, mas não os monobactâmicos. Inibidas pelo EDTA.	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, NDM-1
	B3			L1, CAU-1, FEZ-1
3b	B2	Carbapenêmicos	Hidrólise preferencial de carbapenemas. Inibidas pelo EDTA.	CphA, Sfh-1

Fonte: BUSH & JACOBY, 2010; BUSH, 2013.

Beta-lactamases de Classe A de Ambler

Todas as quatro classes de Ambler de beta-lactamases (classes A, B, C e D) já foram identificadas em *Acinetobacter* (PEREZ *et al.*, 2007). Apesar de uma vasta gama de beta-lactamases de classe A, incluindo TEM (*temoneira*) (CHEN *et al.*, 2006; ENDIMIANI *et al.*, 2007), SHV (*sulphydryl variable*) (NAAS *et al.*, 2007), CTX-M (*cefotaxime hydrolyzing capabilities*) (NAGANO *et al.*, 2004; POTRON *et al.*, 2011), GES (*guiana extended-spectrum*) (MOUBARECK *et al.*, 2009; BOGAERTS *et al.*, 2010), SCO (*self-transferable plasmid from E. coli*) (POIREL *et al.*, 2007), PER (*Pseudomonas extended resistant*) (JEONG *et al.*, 2005; POIREL *et al.*, 2005; BONNIN *et al.*, 2011a; OPAZO *et al.*, 2012), VEB (*vietnam extended-spectrum beta-lactamase*) (NAAS *et al.*, 2006; PASTERÁN *et al.*, 2006), CARB (*carbenicillin hydrolyzing beta-lactamase*) (POTRON *et al.*, 2009; RAMÍREZ *et al.*, 2010) e KPC (*K. pneumoniae carbapenemase*) (ROBLEDO *et al.*, 2010), ter sido relatada em *Acinetobacter*, estas enzimas não são as mais significativas na perspectiva da resistência aos beta-lactâmicos neste gênero.

Estas enzimas pertencentes à classe A de Ambler, atualmente, representam o maior grupo de beta-lactamases estudadas (BUSH *et al.*, 1995) e, entre aquelas com espectro de atividade estreito, TEM-1 (CHEN *et al.*, 2006; ENDIMIANI *et al.*, 2007), SCO-1 (POIREL *et al.*, 2007) e CARB-4 (RAMÍREZ *et al.*, 2010) já foram descritas em *Acinetobacter* spp. Considerando aquelas com espectro de atividades ampliado, PER-1 foi a primeira enzima beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) identificada em *A. baumannii* (VAHABOGLU *et al.*, 1997), enquanto TEM-92 e CARB-10 foram as primeiras variantes TEM e CARB com perfis de ESBL (ENDIMIANI *et al.*, 2007; POTRON *et al.*, 2009) reportadas no gênero. Posteriormente, SHV-12 (HUANG *et al.*, 2004), SHV-5 (NAAS *et al.*, 2007), PER-2 (PASTERÁN *et al.*, 2006) e PER-7 (BONNIN *et al.*, 2011a; OPAZO *et al.*, 2012) também foram exemplos de ESBLs já descritas.

Cepas de *A. baumannii* produtoras de ESBL do tipo VEB-1 foram relatadas, pela primeira vez, na França (NAAS *et al.*, 2006) e, posteriormente, em cidades argentinas (PASTERÁN *et al.*, 2006). Entre as enzimas do tipo VEB, a variante VEB-3 foi relatada somente em amostras de *Acinetobacter* spp. de Taiwan (HUANG *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2010). Além das enzimas descritas até aqui, ESBLs do tipo CTX-M também já foram descritas em *Acinetobacter*, associadas à integrons ou plasmídeos, indicando o potencial de disseminação entre diferentes cepas (NAGANO *et al.*, 2004; POTRON *et al.*, 2011).

Em relação às carbapenemases de classe A, dois grupos podem ser destacados: GES e KPC. A primeira descrição do grupo GES em *Acinetobacter* foi na França e caracterizada como GES-11. (MOUBARECK *et al.*, 2009). Em 2010, esta variante foi novamente descrita em isolados de *A. baumannii* na Bélgica, juntamente com GES-12 e a nova GES-14 (BOGAERTS *et al.*, 2010; BONNIN *et al.*, 2011b). A enzima GES tem como peculiaridade o fato de que substituições de aminoácidos no seu sítio ativo podem ampliar a atividade hidrolítica da enzima, que passa a hidrolisar os carbapenêmicos (BOGAERTS *et al.*, 2010). Finalmente, as variantes KPC-2, KPC-3, KPC-4 e KPC-10 foram as primeiras carbapenemase do tipo KPC identificadas entre as espécies do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* em Porto Rico, sendo esta última descrita pela primeira vez nestas espécies de *Acinetobacter* (ROBLEDO *et al.*, 2010).

Beta-lactamases de Classe C de Ambler

Ainda no contexto das beta-lactamases, as enzimas *AmpC*, pertencentes à classe C de Ambler, também são significativas para o gênero *Acinetobacter* (DANES *et al.*, 2002). Estas enzimas conferem resistência às penicilinas, inclusive às associações com inibidores de beta-lactamases (sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico), cefalosporinas de 1ª, 2ª e 3ª gerações, e aos monobactâmicos (aztreonam) (BUSH *et al.*, 1995). A primeira sequência do gene da cefalosporinase que codifica para *AmpC* beta-lactamase, em *A. baumannii*, foi caracterizada pela primeira vez em 2000 na Espanha (BOU & MARTÍNEZ-BELTRÁN, 2000). Em amostras de *Acinetobacter* spp., *AmpC* não é induzível e, normalmente, é expressa em baixos níveis (BOU & MARTÍNEZ-BELTRÁN, 2000). O aumento da expressão do gene da cefalosporinase é regulado pela sequência promotora do tipo IS*Aba1*, muito comum entre os isolados do gênero (CORVEC *et al.*, 2003, HERITIER *et al.*, 2006; JACOBY, 2009).

Metalo-beta-lactamases

As metalo-beta-lactamase (MBLs) de classe B têm um amplo espectro de substratos e podem catalisar a hidrólise de praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos com a exceção de monobactâmicos. Caracterizam-se por apresentarem um íon metálico no sítio ativo, geralmente o zinco (Zn²⁺), que participa da catálise. Essa classe de enzimas é inibida por agentes quelantes, como o EDTA ou ácido 2-mercaptopropiônico, mas não é afetada pelos inibidores convencionais de beta-

lactamases, como o ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (QUEENAN & BUSH, 2007; PALZKILL *et al.*, 2013).

Este grupo de enzimas foi, inicialmente, descoberto há mais de quarenta anos atrás, mas não foi, inicialmente, considerado um sério problema para a terapia antimicrobiana, porque foi caracterizado em cromossomos de microrganismos não patogênicos (PALZKILL *et al.*, 2013). No entanto, esta situação mudou nos anos 1990, com a propagação das MBLs dos tipos IMP (*Imipenemase*) e VIM (*Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*) em patógenos Gram-negativos, incluindo *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (LARAKI *et al.*, 1999; LAURETTI *et al.*, 1999). A recém-descoberta MBL do tipo NDM (*New Deli Metallo-beta-lactamase*)-1 compreende um exemplo do potencial de disseminação destas enzimas. NDM-1 foi detectado pela primeira vez em 2008, em *K. pneumoniae* e *Escherichia coli*, em um paciente que retornou para Suécia depois de uma viagem à Índia. Desde então, NDM tem sido reportado com uma frequência significativa em diferentes espécies bacterianas em vários países do mundo (YONG *et al.*, 2009).

Embora as MBLs não sejam as carbapenemases predominantes em *Acinetobacter*, VIM, IMP e SIM (*Seoul imipenemase*) já foram encontradas contribuindo para o alto nível de resistência aos carbapenêmicos. A primeira enzima VIM foi descrita por Yum em 2002 (YUM, 2002). Depois disso, várias outras variantes, incluindo VIM-1 (TSAKRIS *et al.*, 2006; TSAKRIS *et al.*, 2008; PAPA *et al.*, 2009), VIM-3 (LEE *et al.*, 2008), VIM-4 (TSAKRIS *et al.*, 2008; PAPA *et al.*, 2009), e VIM-11 (LEE *et al.*, 2008), foram identificadas em *A. baumannii*. Enzimas do tipo IMP também foram relatadas em várias bactérias Gram-negativas, em todo o mundo, incluindo *A. baumannii* e pelo menos nove variantes IMP já foram relatadas IMP-1 (TOGNIM *et al.*, 2006), IMP-2 (RICCIO *et al.*, 2000), IMP-4 (CHU *et al.*, 2001; KOH *et al.*, 2007), IMP-5 (DA SILVA *et al.*, 2002), IMP-6 (GALES *et al.*, 2003), IMP-8 (LEE *et al.*, 2008), IMP-11 (YAMAMOTO *et al.*, 2011), IMP-19 (YAMAMOTO *et al.*, 2011) e IMP-24 (LEE *et al.*, 2008). A MBL do tipo SIM-1 é a única enzima SIM que foi relatado em *A. baumannii* (LEE *et al.*, 2005). Mais recentemente, NDM foi observada em diferentes espécies do gênero (FU *et al.*, 2015).

New Deli Metallo-beta-lactamase - NDM

NDM foi relatada pela primeira vez na literatura, em 2009, e, desde então, é uma das carbapenemases mais significativas (ZMARLICKA *et al.*, 2015). Apesar de ser uma carbapenemase de classe B de Ambler, NDM apresenta baixa identidade

com as demais MBLs, sendo VIM-1/VIM-2 a mais similar com somente 32.4% de identidade (YONG *et al.*, 2009). Até o momento, 13 variantes de NDM, NDM-1 a -14 foram identificadas (ZMARLICKA *et al.*, 2015). Como todas as outras enzimas do grupo, NDM hidrolisa de forma eficiente uma ampla gama de beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, exceto monobactâmicos, tais como aztreonam (DORTET *et al.*, 2014).

Uma significativa associação com outros determinantes de resistência aos antibióticos tem sido observada em quase todos os microrganismos produtores de NDM (*Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*). Entre esses determinantes associados, estão as cefalosporinases *AmpC*, as ESBLs, outros tipos de carbapenemases como KPC, OXA-48 e VIM, além de determinantes de resistência aos aminoglicosídeos (16SRNA metilases), às quinolonas (*qnr*), aos macrolídeos (esterases), à rifampicina (enzimas modificadoras rifampicina), ao cloranfenicol, e ao sulfametoxazol (CASTANHEIRA *et al.*, 2011; POIREL *et al.*, 2011a; POIREL *et al.*, 2011b; BARGUIGUA *et al.*, 2013; DOLEJSKA *et al.*, 2013; SAMUELSEN *et al.*, 2013).

Bactérias produtoras de NDM vêm sendo associadas a diferentes quadros infecciosos, tais como infecções do trato urinário, peritonites, septicemia e infecções respiratórias em diferentes regiões do mundo (DORTET *et al.*, 2014). Apesar de ser mais comumente detectada em *Enterobacteriaceae*, NDM também vem sendo reportada em bactérias do gênero *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. (BOGAERTS *et al.*, 2012; JOVCIC *et al.*, 2011). Em *Acinetobacter*, NDM já foi descrito em *A. junii*, *A. haemolyticus*, *A. baumannii*, *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus*, *A. junii*, *A. soli*, *A. lwoffii*, *A. pittii*, entre outros (FU *et al.*, 2015). A facilidade de disseminação desta MBL entre bactérias de diferentes gêneros e a sua propagação em diferentes áreas do mundo é preocupante. A Figura 1.4 ilustra a distribuição de relatos de casos de NDM no mundo de acordo com a última revisão de Zmarlicka e colaboradores (2015).

Estudos moleculares que envolvem a caracterização de isolados bacterianos NDM-positivos mostram um quadro muito complexo (JOHNSON & WOODFORD, 2013). Em *Enterobacteriaceae*, o gene *bla_{NDM}* está localizado, principalmente, em plasmídeos conjugativos pertencentes a vários grupos de incompatibilidade. Em *Acinetobacter* spp., pode ser encontrado em plasmídeos ou localizado no cromossomo, enquanto que, em *P. aeruginosa*, o gene foi descrito no cromossomo. No entanto, investigações em todo o mundo apontam que a propagação de *bla_{NDM}*

não está relacionada com clones específicos, plasmídeos específicos, ou uma estrutura genética única (JOHNSON & WOODFORD, 2013; ZMARLICKA *et al.*, 2015).

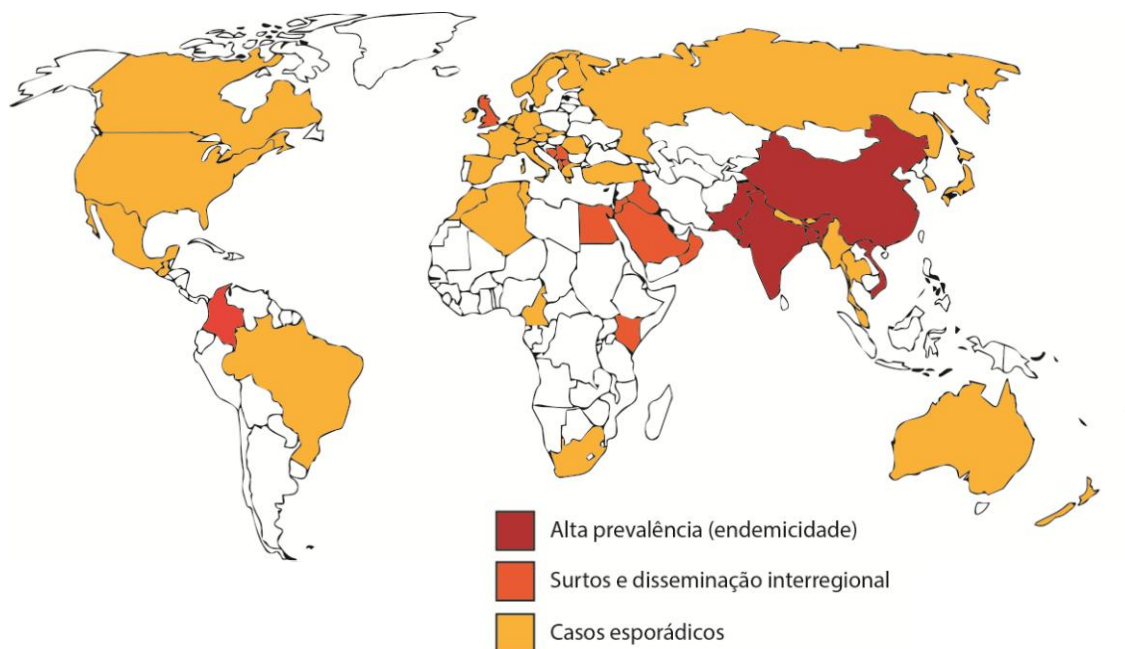


Figura 1.4 Distribuição geográfica de NDM (Fonte: ZMARLICKA *et al.*, 2015).

Investigações sobre o ambiente genético, em que se encontra o gene que codifica para NDM, mostram a presença de uma estrutura conservada sempre associada: (i) à sequência de inserção do tipo IS*Aba125*, completa ou truncada, na extremidade 5'; (ii) e ao gene *ble*_{MBL}, que codifica a resistência ao fármaco anticancerígeno bleomicina, na extremidade 3' (NORDMANN *et al.*, 2011). Em *Acinetobacter*, *bla*_{NDM} encontra-se, principalmente, entre duas cópias da IS*Aba125*, formando o transposon composto *Tn125*. A identificação de uma forma truncada do *Tn125*, em *Enterobacteriaceae*, também já foi descrita (DORTET *et al.*, 2014).

No Brasil, a primeira identificação de NDM foi, em 2013, em *Providencia rettgeri* isolada de um paciente diabético com doença vascular periférica no estado do Rio Grande do Sul (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013). No entanto, um estudo retrospectivo sugeriu que isolados de *Enterobacter* spp. produtores de NDM estariam circulando no país desde 2012 (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2014). Desde então, relatos em diferentes espécies foram publicados (ROZALES *et al.*, 2014; CARNEIRO *et al.*, 2014; PILLONETO *et al.*, 2014; PAGANO *et al.*, 2015). O primeiro caso em *Acinetobacter* (*A. baumannii*), no país, foi reportado em 2014 no Paraná (PILLONETTO *et al.*, 2014).

Oxacilinas

Entre as enzimas que hidrolisam os beta-lactâmicos, as oxacilinas são as mais importantes no contexto das espécies de *Acinetobacter*. As beta-lactamases de classe D ou oxacilinas (OXA) são enzimas que apresentam o grupamento serina no seu sítio ativo. Apesar da classe incluir, principalmente, enzimas com taxas de hidrólise mais elevadas para cloxacilina e oxacilina do que para benzilpenicilina (daí o nome, oxacillinas), nem todas as oxacilinas têm essa característica. Entre as quatro classes moleculares, a das beta-lactamases do tipo OXA é a mais diversa. Esta diversidade é observada tanto em nível genético quanto bioquímico, com enzimas possuindo desde um espectro estreito até atividade de carbapenemase. As enzimas de classe D, geralmente, não são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam, e sulbactam, porém a sua atividade pode ser inibida *in vitro* por cloreto de sódio (NaCl) (POIREL *et al.*, 2010).

Muitos genes que codificam para as beta-lactamases de classe D são incorporados a integrons, mas também a outras estruturas genéticas específicas, incluindo sequências de inserção e transposons. Numerosos genes de oxacilinas têm sido identificados como uma fonte de resistência adquirida em bactérias Gram-negativas, mas estudos recentes também têm demonstrado que estas beta-lactamases podem ser produzidas naturalmente tanto por agentes patogênicos clinicamente significativos quanto por espécies ambientais (POIREL *et al.*, 2010).

Como mencionado, anteriormente, algumas beta-lactamases do tipo OXA também podem hidrolisar carbapenêmicos. Em geral, a hidrólise do imipenem, ainda que lento, é mais rápida do que a do meropenem (HERITIER *et al.*, 2003). Contudo, nenhuma dessas enzimas com atividade de carbapenemase hidrolisa significativamente cefalosporinas de espectro estendido. A maioria destas enzimas com atividade de carbapenemases é encontrada em *Acinetobacter* spp. (POIREL *et al.*, 2006). As OXAs com perfil de carbapenemases podem ser classificadas em 12 subgrupos como mostrado na Tabela 1.5 (EVANS & AMYES, 2014).

Tabela 1.5 Carbapenemases do tipo OXA e as espécies de *Acinetobacter* spp. associadas

Subgrupo	Enzimas	Espécies de <i>Acinetobacter</i> spp.
OXA-23-like	OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133, OXA-134, OXA-146, OXA-165–OXA-171, OXA-225, OXA-239	<i>A. baumannii</i> , <i>A. junii</i> , <i>A. radioresistens</i> , <i>A. pittii</i> , <i>Acinetobacter</i> phenon 5, <i>Acinetobacter</i> phenon 6/ct 13TU, <i>A. nosocomialis</i> , <i>Acinetobacter</i> genomic species 10/11, <i>A. lwoffii</i> , <i>A. baylyi</i>
OXA-24/40-like	OXA-40, OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207	<i>A. baumannii</i> , <i>A. haemolyticus</i> , <i>A. pittii</i> , <i>A. baylyi</i> , <i>A. calcoaceticus</i>
OXA-51-like	OXA-51, OXA-64–OXA-71, OXA-75–OXA-80, OXA-82–OXA-84, OXA-86–OXA-95, OXA-98–OXA-100, OXA-104, OXA-106–OXA-113, OXA-115–OXA-117, OXA-120–OXA-128, OXA-130–OXA-132, OXA-138, OXA-144, OXA-148–OXA-150, OXA-172–OXA-180, OXA-194–OXA-197, OXA-200–OXA-203, OXA-206, OXA-208, OXA-216, OXA-217, OXA-219, OXA-223, OXA-241, OXA-242, OXA-248–OXA-250, OXA-254	<i>A. baumannii</i> , <i>A. nosocomialis</i>
OXA-58-like	OXA-58, OXA-96, OXA-97, OXA-164	<i>A. baumannii</i> , <i>A. pittii</i> , <i>A. nosocomialis</i> , <i>Acinetobacter</i> phenon 6/ct 13TU, <i>A. junii</i> , <i>Acinetobacter</i> genomic species 9, <i>A. bereziniae</i> , <i>A. calcoaceticus</i> , <i>A. radioresistens</i>
OXA-134a-like	OXA-134a, OXA-186–OXA-191	<i>A. lwoffii</i>
OXA143-like	OXA-143, OXA-182, OXA-231, OXA-253, OXA-255	<i>A. baumannii</i> , <i>A. pittii</i>
OXA-213-like	OXA-213	<i>A. calcoaceticus</i>

Tabela 1.5 Continuação

Subgrupo	Enzimas	Espécies de <i>Acinetobacter</i> spp.
OXA-214-like	OXA-214, OXA-215	<i>A. haemolyticus</i>
OXA-211-like	OXA-211, OXA-212, OXA-309	<i>A. johnsonii</i>
OXA-229-like	OXA-228–OXA-230, OXA-257	<i>A. bereziniae</i>
OXA-235-like	OXA-235–OXA-237, OXA-278	<i>A. schindleri</i>
OXA-48-like	OXA-48, OXA-48b, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-247	<i>A. baumannii</i>

Fonte: EVANS & AMYES, 2014.

A maioria dos grupos oxacilinasas tem sido identificada em plasmídeos, com a exceção dos grupos intrínsecos de algumas espécies. Particularmente, em *A. baumannii*, estes plasmídeos são muito variados em tamanho e conteúdo genético (BERTINI *et al.*, 2010). A expressão e a mobilização destas enzimas do tipo OXA estão estritamente relacionadas com elementos genéticos móveis, principalmente, as sequências de inserção (IS). Nas espécies de *Acinetobacter*, as ISs são frequentemente identificadas em associação com um gene de uma OXA beta-lactamase (DIJKSHOORN *et al.*, 2007).

O mais prevalente destes elementos genéticos móveis é IS*Aba1*, descrito pela primeira vez em *A. baumannii* no ano de 2001. IS*Aba1* já foi identificado em associação com diferentes oxacilinasas, tais como os *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-235}. Quando IS*Aba1* está localizada a montante do genes *bla*_{OXA}, ele tende a aumentar a sua expressão a um nível que confere resistência aos carbapenêmicos. A localização de IS*Aba1* a 25pb a montante do *bla*_{OXA-23-like} proporciona uma sequência de promotor que dirige a transcrição do gene. Do mesmo modo, quando é localizado 7pb a montante do gene *bla*_{OXA-51-like}, pode aumentar os níveis de expressão gênica 50 vezes. Em adição ao seu papel na expressão de genes, IS*Aba1* também parece ser responsável para a sua mobilização e um número de diferentes transposons contendo IS*Aba1*, seja isoladamente ou em múltiplas cópias, já foi identificado. A sequência de inserção do tipo IS*Aba3* também é, frequentemente, encontrada em associação com genes *bla*_{OXA-58-like}, muitas vezes, com uma cópia a montante e a jusante do gene da beta-lactamase, formando um transposon característico (EVANS & AMYES, 2014).

Estudos recentes têm mostrado que muitas espécies do gênero *Acinetobacter* spp. possuem genes das beta-lactamases de classe D cromossomais e de ocorrência natural, entre os quais, incluem: *bla*_{OXA-23-like} em *A. radioresistens*, *bla*_{OXA-51-like} em *A. baumannii*, *bla*_{OXA-134-like} em *A. Iwoffii/A. schindleri*, *bla*_{OXA-211-like} em *A. johnsonii*, *bla*_{OXA-213-like} em *A. calcoaceticus*, *bla*_{OXA-214-like} em *A. haemolyticus*, e *bla*_{OXA-228-like} em *A. bereziniae*. Alguns destes genes intrínsecos também já foram detectados em outras espécies como, por exemplo, *bla*_{OXA-23} comumente adquirido em *A. baumannii* e também em outras espécies de gênero; e *bla*_{OXA-51} relatado em *A. nosocomialis*. Nesses casos, a mobilização foi associada a IS*Aba1* (KAMOLVIT *et al.*, 2014).

A primeira oxacilinasase com atividade carbapenemase foi a OXA-23 (também conhecido como ARI-1), detectado em *A. baumannii* na Escócia (PATON *et al.*,

1993). Desde então, o gene *bla*_{OXA-23} é o mais disseminado em todo o mundo (MUGNIER *et al.*, 2010). Os países que têm relatado *Acinetobacter* com OXA-23 incluem França (HÉRITIER *et al.*, 2005; NAAS *et al.*, 2005), Alemanha (KOHLENBERG *et al.*, 2009), Bulgária (STOEVA *et al.*, 2008), Romênia (BONNIN *et al.*, 2011c), Estados Unidos (ADAMS *et al.*, 2008), Colômbia (BEENKEN *et al.*, 1991), Brasil (CARVALHO *et al.*, 2009), Austrália (VALENZUELA *et al.*, 2007), Taiwan (LIN *et al.*, 2011), China (LI *et al.*, 2014c), Coreia (LEE *et al.*, 2011), Singapura (KOH *et al.*, 2012), Itália (PRINCIPE *et al.*, 2014) e Espanha (MOSQUEDA *et al.*, 2013). Os genes deste subgrupo de enzimas são intrínsecos à *A. radioresistens*, mas também são frequentemente encontrados em plasmídeos de outras diferentes espécies de *Acinetobacter*, bem como bactérias da família *Enterobacteriaceae* (*Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*) (EVANS & AYMES, 2014).

Embora não seja tão prevalente como OXA-23-like, enzimas OXA-58-like também são distribuídas globalmente (COELHO *et al.*, 2006). No entanto, eles são detectados com maior frequência nos países do Sul da Europa. Já o subgrupo OXA-24/40-like, até recentemente, parecia estar restrito à Península Ibérica, onde tem sido o grupo de beta-lactamases do tipo OXA predominante (QUINTEIRA *et al.*, 2007; RUIZ *et al.*, 2007; VILLALON *et al.*, 2013). Contudo, trabalhos têm identificado em diferentes outros locais, tais como China, Coreia do Sul, Taiwan, Itália, Espanha, França (BARNAUD *et al.*, 2010; CANDEL *et al.*, 2010; DI POPOLO *et al.*, 2011), Colômbia (SAAVEDRA *et al.*, 2014) e Brasil (WERNECK *et al.*, 2011). Na América, dois subgrupos parecem estar restritos ao continente até o momento: OXA-143-like e OXA-235-like. OXA-143-like foi descrita, pela primeira vez, em 2009 a partir de um isolado de *A. baumannii* no Brasil do ano de 2004 e tem estado restrito ao país (HIGGINS *et al.*, 2009). Já OXA-235-like foi descrito a partir de isolados dos EUA e México (HIGGINS *et al.*, 2013).

No Brasil, *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos estão, normalmente, relacionados às oxacilinas, principalmente, do tipo OXA-23-like. A primeira descrição de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos produtores desta enzima foi em 2003, relacionados a um surto, no Hospital das Clínicas e no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (DALLA-COSTA *et al.*, 2003). Após este primeiro relato, casos de *A. baumannii* produtores de OXA-23 em diferentes estados foram publicados, incluindo Maranhão (FONSECA *et al.*, 2013), Minas Gerais (CLÍMACO *et al.*, 2013), Paraná (SCHIMITH BIER *et al.*, 2010; CIESLINSKI *et al.*, 2013), Rio de Janeiro (CARVALHO *et al.*, 2009), Rio Grande do Sul

(MARTINS *et al.*, 2010) e São Paulo (FURTADO *et al.*, 2011). Outros subgrupos também já foram reportados no país. Em 2010, foi descrita a ocorrência da enzima OXA-72 (subgrupo OXA-24-like) em *A. baumannii* no país e, no ano seguinte, ocorreu o primeiro relato da produção da enzima OXA-58 em isolados clínicos de pacientes do Rio de Janeiro (WERNECK *et al.*, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2011). Desde a primeira descrição, a incidência e prevalência de *Acinetobacter* spp. multirresistentes produtores de oxacilinasas têm aumentado no país.

1.5 Justificativa

Acinetobacter spp. produtor de carbapenemases é um importante patógeno nosocomial responsável por diferentes tipos de infecções como pneumonias, bacteremias, infecções urinárias e meningites em diferentes países, incluindo o Brasil. Durante a última década, o tratamento das infecções por este microrganismo tem se tornado crítico. Os carbapenêmicos são, normalmente, o tratamento de escolha dessas infecções, principalmente, com a emergência da resistência aos outros beta-lactâmicos, aos aminoglicosídeos e as quinolonas. No entanto, a rápida expansão da resistência aos carbapenêmicos tem preocupado e limitado o tratamento ao uso de polimixinas. A hiperprodução de enzimas carbapenemases, principalmente, as do tipo OXA e, com menos frequência, as MBLs, destacam-se neste cenário de resistência aos carbapenêmicos entre as bactérias do gênero.

O aumento da frequência das IRAS associadas às espécies de *Acinetobacter* spp. e o rápido desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos entre estes microrganismos já se estabeleceram como um grave problema e alertam para a necessidade de detecção e caracterização de tais microrganismos. No Brasil, os estudos relacionados à caracterização de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. e a detecção de carbapenemases se baseiam em análises locais ou de regiões específicas. Deste modo, para uma melhor compreensão da epidemiologia de *Acinetobacter* spp. produtores de carbapenemases, tornam-se necessários estudos que avaliem isolados clínicos provenientes de diferentes estados brasileiros, permitindo entender a distribuição de possíveis clones e como medidas de controle poderiam ser implementadas. A investigação dos isolados oriundos de diferentes regiões do Brasil trará uma visão ampliada sobre o perfil de suscetibilidade, os mecanismos de resistência e o perfil de distribuição e disseminação de genótipos ou grupos clonais no país.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O trabalho tem como objetivo caracterizar, fenotipicamente e molecularmente, isolados de *Acinetobacter* spp., com perfis de resistência a múltiplas drogas provenientes de diferentes estados brasileiros, pertencentes à Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse Hospitalar do IOC (CCBH).

2.2 Objetivos Específicos

i) Identificar bioquimicamente e através de marcadores moleculares os isolados bacterianos.

ii) Verificar o perfil de suscetibilidade aos diferentes grupos antimicrobianos;

iii) Investigar os principais genes de carbapenemases entre os isolados de *Acinetobacter* spp. através da PCR;

iv) Pesquisar a presença da sequência de inserção do tipo IS*Aba1* e sua associação com os genes das oxacilinases entre os isolados de *A. baumannii* através da PCR.

v) Avaliar o polimorfismo genético e a relação de clonalidade dos isolados de *A. baumannii* através do PFGE e do MLST.

vi) Investigar a localização genética do gene *bla_{NDM}* no isolado de *A. bereziniae* através de extração plasmidial por lise alcalina e hibridação.

vii) Realizar o sequenciamento de alta vazão do genoma de um isolado de *A. baumannii* representante do principal complexo clonal circulante (CC15) e do isolado de *A. bereziniae*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos e suas respectivas discussões serão apresentados sob a forma de manuscritos publicados em revistas indexadas. A lista dos trabalhos apresentados encontra-se a seguir:

CHAGAS TPG, CARVALHO KR, OLIVEIRA SANTOS IC, CARVALHO-ASSEF APD, ASENSI MD. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79(4): 468-472.

CHAGAS TPG, SILVEIRA MC, ALBANO RM, CARVALHO-ASSEF APD, ASENSI MD. Draft genome sequence of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST15 (CC15) isolated from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110(5): 691-692.

CHAGAS TPG, CARVALHO-ASSEF APD, AIRES, CAM, BERTOCINI R, ASENSI MD. Detection of an NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* strain in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* 2015; 3: 147-148.

Para uma melhor adequação ao formato da tese, os artigos foram inseridos no formato de documento de texto. A formatação original dos artigos, de acordo com as revistas onde foram publicados, encontra-se em anexo (ANEXO B).

3.1 Caracterização de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos no Brasil (2008-2011): disseminação clonal dos complexos CC15 e CC79

Article title: Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): Countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79).

Author names: Thiago Pavoni Gomes Chagas[‡], Karyne Rangel Carvalho[‡], Ivson Cassiano de Oliveira Santos^a, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef^a and Marise Dutra Asensi^{a*}

[‡] Authors contributed equally to this work.

^a Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil.

*Corresponding author: Marise Dutra Asensi, Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar - Oswaldo Cruz Institute - FIOCRUZ - Brazil (email: marise@ioc.fiocruz.br; phone number: +552125621636; FAX number: +552125621634).

This report were presented in part at the 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, Germany, 2013 [ePoster VI session, eP753]

Abstract

The study investigated the genetic relationship of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolated from inpatients during 2008 to 2011 from 11 Brazilian states. Antimicrobial susceptibility profile was determined by disc diffusion method and Etest. PCR was applied for carbapenemase genes and IS*Aba1*. Isolates were subjected to PFGE and MLST for molecular typing. Most of the isolates showed high resistance rates to antibiotics tested. The *bla*_{OXA-51-like} gene was found in all isolates and 146 (94.2%) isolates were positive for *bla*_{OXA-23-like}. In the most OXA-23-producing isolates the *bla*_{OXA-23-like} gene was accompanied by IS*Aba1*. A total of 146 OXA-23-producing isolates were clustered into twenty-eight genotypes by PFGE. Molecular analysis by MLST identified 13 STs. The most prevalent PFGE profiles were designated as ST15 (CC15), ST1 (CC1) and ST79 (CC79). This study showed the widespread of clonal complexes of *A. baumannii* harbouring the *bla*_{OXA-23-like} gene in different Brazilian states.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, carbapenem resistance, OXA-23, MLST, Brazil.

1. Introduction

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen increasingly affecting severely ill patients. This microorganism is highly capable of surviving and spreading in the hospital environment and to develop resistance to antimicrobial agents. In the last years, carbapenem resistance has been reported among *A. baumannii* isolates and is often associated to infections with high morbidity and mortality rates. Carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases of the oxacilinases are the most important cause of carbapenem resistance in *A. baumannii* worldwide (Zarrilli et al., 2013, Poirel and Nordmann, 2006 and Poirel and Nordmann, 2005).

In Brazil, *A. baumannii* has become particularly problematic because of its prevalence and the carbapenems resistance, usually related to oxacilinases, mostly involving OXA-23 producers, with reports of local outbreaks since the late 90s (Carvalho et al., 2009 and Dalla-Costa et al., 2003). The first report of *A. baumannii* resistant to carbapenems was in 2003 with the description of eight isolates collected from hospitalized patients hospitalized at two hospitals in the Southern Brazil (Curitiba - Paraná State). These isolates were OXA-23-producers and were part of the same clone, demonstrating the occurrence of inter-hospital spread in that city (Dalla-Costa et al., 2003). In 2009, we described the spread of MDR OXA-23-producing *A. baumannii* clones in the city of Rio de Janeiro: two clones were

prevalent, one being scattered at seven hospitals and the second one in other five hospitals (Carvalho et al., 2009). In the following years, this microorganism has been identified in other Brazilian states.

Molecular epidemiological studies are important tools to clarify the dissemination of MDR *A. baumannii*, to understand epidemic dynamics and to identify the most efficient control measures. Thus, this study aimed to characterize carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates recovered in 11 Brazilian states over a 3-years period (2008-2011), determining their genetic relationship by MLST analysis.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial isolates

A total of 155 *A. baumannii* clinical isolates representing 11 Brazilian states belonging to five different geographical regions of this country were included. They were collected at the Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS)/Mato Grosso do Sul-MS (n=9) and Central Public Health Laboratories (LACENs) of Alagoas-AL (n=2), Amazonas-AM (n=1), Bahia-BA (n=1), Distrito Federal-DF (n=2), Espírito Santo-ES (n=26), Goiás-GO (n=58), Minas Gerais-MG (n=8), Rio de Janeiro-RJ (n=44), Rio Grande do Norte-RN (n=3) and Santa Catarina-SC (n=1) from February 2008 to January 2011 (one per patient). The most frequent sites of isolation for these isolates were blood (18.7%), respiratory tract secretions (18.0 %), catheter (13.5%) and urine (3.9%).

2.2. Identification and antimicrobial susceptibility testing

A. baumannii isolates were identified by classical biochemical techniques, amplification of the *rpoB* (Gundi et al., 2009) and *bla*_{OXA-51-like} gene and by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) (Vanechoutte et al., 1995). The disc diffusion method was used to evaluate susceptibility to the following antimicrobial agents according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2012). MIC values for imipenem, meropenem, polymyxin B and tigecycline were determined by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) (CLSI, 2012).

2.3. Molecular investigations

A multiplex polymerase chain reaction (PCR) was used to detect genes encoding the OXA-like carbapenemases OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 and

OXA-143 (Higgins et al., 2010). Additional screening of other carbapenemase encoding genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}) and insertion sequence IS*Aba*1 was performed by PCR (Nordmann et al., 2011, Naas et al., 2008 and Turton et al., 2006). To determine whether IS*Aba*1 was present upstream of *bla*_{OXA-51-like} and *bla*_{OXA-23-like} gene, PCR mapping experiments using IS*Aba*1 forward/OXA-51-like reverse or OXA-23-like reverse primers (IS*Aba*1F/OXA-51-likeR or OXA-23-likeR PCR) were performed (Pagano et al., 2013 and Chaulagain et al., 2012).

PFGE typing was performed using *Apal* restriction enzyme (Carvalho et al., 2009). DNA fragments were separated on 1% (w/v) agarose gels in 0.5% Tris-borate-EDTA buffer using a CHEF DRIII apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA). The patterns obtained were analysed by BioNumerics v.4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) with Dice similarity coefficient analysis. The unweighted-pair group method using average linkages was applied and the bandwidth tolerance was set at 1.5%. Isolates clustering together with 85% level of similarity were considered to belong to the same genotype.

Isolates representing OXA-23-producing *A. baumannii* PFGE clones were further tested by the MLST scheme developed by the Institute Pasteur (IP) (www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html) (Diancourt et al., 2010). DNA sequencing was performed with Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analyzed using an ABI Prism 3100 genetic analyser (Applied Biosystems) at the PDTIS-IOC DNA Sequencing Platform. To determine the CCs (complex clonal), *eBURST* software (<http://eburst.mlst.net/>) was used.

3. Results

3.1. Resistance patterns and screening of carbapenemase encoding genes and insertion sequence IS*Aba*1

According to the results of the antimicrobial susceptibility testing, all antimicrobials tested showed elevated resistance rate and the most of the isolates were resistant to more than five different classes of antibiotics. Ciprofloxacin, cefepime and piperacillin/tazobactam showed the highest resistance rate (99.4%, n=154), followed by ceftazidime (97.4%, n=151), imipenem (95.5%, n=148), meropenem (94.2%, n=146) and ampicillin/sulbactam (93.5%, n=145).

Sulfamethoxazole/trimethoprim showed the highest susceptibility rate (23.9%, n=37) followed by amikacin (11.6%, n=18).

All isolates showed the presence of *bla*_{OXA-51-like} gene, originally intrinsic to *A. baumannii*, and none were positive for *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like} and *bla*_{OXA-143-like}. The presence of *bla*_{OXA-23-like} gene was confirmed in most carbapenem-resistant isolates (n=146; 94.2%) and the IS*Aba1* element was detected upstream of the *bla*_{OXA-23} gene in almost all OXA-23-producing isolates. By additional screening, genes encoding for KPC and NDM were not found.

By MIC results, all OXA-23 producing isolates were highly resistant to carbapenem (MIC > 32 µg/mL) except for one isolate that showed a MIC of 2.0 µg/mL for meropenem. For polymyxin B, MIC range was 0.19 - 0.50 µg/mL and MIC₅₀/MIC₉₀ values were of 0.38/0.50 µg/mL respectively. Considering tigecycline, MIC range was 0.19 - 6 µg/mL and MIC₅₀/MIC₉₀ values were of 3/6 µg/mL respectively. Among the 9 isolates non-OXA-23-producing, five were resistant to imipenem and/or meropenem and the IS*Aba1* element was found upstream of the *bla*_{OXA-51} gene by PCR mapping.

3.2. Molecular typing

Based on PFGE analysis, the 146 OXA-23-producing isolates were clustered into 28 genotypes (Table 1). The most prevalent was Ab1 (37.4% of isolates; n = 58) found in eight states belonging to different geographical regions (DF, ES, GO, MG, RJ, RN, SC and MS), followed by Ab2 (18.7%; n= 29) found in GO and MS; and genotype Ab3 (9.7%; n=15) found in five states (DF, ES, MG, RJ and RN).

MLST performed on 44 isolates representing PFGE OXA-23-producing clones, including isolates from each state, allowed us to identify 13 sequence types (STs) as showed in the Table 1. Four new STs were first described in our study and were deposited in the MLST database (ST316, ST317, ST318 and ST319). The most prevalent PFGE profiles Ab1, Ab2 and Ab3 were designated ST15, ST1 and ST79 respectively. The ST1 was found in Mid-west (GO, MS), North-east (RN) and South-east (MG). In RJ, we also identified ST160 (genotype Ab21), ST162, (genotype Ab8 and Ab9) ST188 (genotype Ab6) and ST316 (genotype Ab20). In the North (AM), Mid-west (MS) and South-east (MG, RJ), we also observed the ST25 (genotype Ab27, Ab28 and Ab29).

By *eBURST*, we found 6 major complexes (CC1, CC15, CC25, CC33, CC79 and CC162), which included mainly single-locus variants or less commonly, double-

locus variants (Figure 1). Some STs described in this study were singletons (ST107 and ST319). Phylogenetic analysis showed that ST79 and ST15 belong to the CC79 and CC15 respectively. The CC15 (ST15 and ST318) was described in 9 of 10 Brazilian states studied (AL, DF, ES, GO, MG, RJ, RN, SC and MS) belonging to the four different geographical regions of the country. The OXA-23-producing isolates belonging CC79 (ST79) were found in 8 of 10 states (AL, DF, ES, GO, MS, MG, RJ and RN). The ST1 and ST160 were grouped in CC1 observed in GO, MG, MS, RJ and RN. Other CCs were found into our isolates (CC25, CC33 and CC162) as observed in Figure 1 and the distribution of them may be observed in Figure 2.

4. Discussion

This study described the resistance profiles and genetic relatedness of CRAB isolates collected in different Brazilian hospitals during a 3-years beginning in February 2008. In recent years, *A. baumannii* has been commonly reported as resistant to multiple drugs and the resistance rates to imipenem, meropenem, ceftazidime, piperacillin/tazobactam, ciprofloxacin and gentamicin in Latin America seem to be among the world's largest (Peleg et al., 2008). Antimicrobial Surveillance Program involving Latin America, imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. rates increased from 6.4%, 12.6%, and 0.0% in the 1997-1999 to 84.9%, 71.4%, and 50.0% in 2008-2010 respectively in Argentina, Brazil, and Chile (Gales et al., 2012). *A. baumannii* MDR has also been reported in some countries in South America, such as Brazil, Argentina and Colombia (Fiorilli et al., 2010 and Villegas et al., 2007). All the *A. baumannii* clinical isolates included in this study were MDR, which constitute a therapeutic problem of serious concern and affect the clinical outcome of serious infections caused by such pathogens.

In this work, we noted that the carbapenem resistance mediated by the enzyme OXA-23 was found in most isolates from different Brazilian states, confirming several reports of outbreaks *A. baumannii* that have this mechanism of resistance (Carvalho et al., 2009). According to Clímaco et al (2013), the spread of OXA-23 is most likely due to mobile elements (i.e., plasmids, transposons, insertion sequence). In previous report, we showed that the *bla*_{OXA-23} gene was consistently associated with transposon, *Tn2006*, and was chromosomally encoded in all carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates studied (Grosso et al., 2011). Our results also indicated that some isolates carried the *bla*_{OXA-23-like} gene with an IS*Aba1* upstream and these findings are in accordance with the results of other studies. As previously

demonstrated by European and Brazilian reports (Pagano et al., 2013), the degree of carbapenem resistance in *A. baumannii* isolates may be accentuated by the presence of promoter sequences provided by IS*Aba*1, leading to expression of the OXA-23.

Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene has been associated with specific clones. The study revealed that the most prevalent PFGE profiles Ab1 (n = 58 isolates) and other genotypes (Ab1, Ab24, Ab32 and Ab33) belonged to CC15 (ST15 and ST318) from 9 Brazilian states. According Diancourt et al, *A. baumannii* belonging to ST15 have experienced evolutionary success and almost universally exhibit MDR phenotypes, which facilitated their rapid clonal expansion during recent years (Diancourt et al., 2010). This complex has been identified in several European countries, including Italy, Spain, Greece and Turkey (Di Popolo et al., 2011, Gogou et al., 2011 and Villalon et al., 2011).

In Latin America (Argentina and Brazil), OXA-23-producing *A. baumannii* strains have been commonly reported as belonging to CC79 (Martins et al., 2013, Stietz et al., 2013 and Grosso et al., 2011). We characterized the CC79 in 8 Brazilian states representing the second major clonal complex in the country, followed by CC1. This CC1 is designated as the second major *A. baumannii* clone with a broad international distribution (Karah et al., 2012). We and other previous reports described the ST79 and ST15 in public and private hospitals in Rio de Janeiro (South-east) (Martins et al., 2013 and Grosso et al, 2011). In the current study, we showed that these STs were also disseminated along the country over the past 3 years.

Despite of non-OXA-23-producing, we found five carbapenem-resistant isolates and these results may be explained by the presence of the IS*Aba*1 element upstream the *bla*_{OXA-51} gene. As reported by other studies, the reduced susceptibility to carbapenems in non-OXA-23 isolates may be mediated by gene *bla*_{OXA-51-like}, which is normally little expressed. However, the presence of the insertion sequence IS*Aba*1 or IS*Aba*9 is required for increased expression associated with other mechanisms such as reduced permeability of the outer membrane or over expression of efflux pumps (Nordmann et al., 2011 and Figueiredo and Poirel, 2009).

In conclusion, we report here the presence of MDR *A. baumannii* carrying the same carbapenem-resistance determinant (*bla*_{OXA-23} gene) with clonal country widespread dissemination of CC15 and CC79. These results confirmed the wide geographical distribution of OXA-23 among clinical carbapenem-resistant *A.*

baumannii isolates in Brazil. The dissemination of these major clusters of MDR *A. baumannii* in different states harboring *bla*_{OXA-23} gene illustrated the success that this organism has to acquire carbapenem resistance and emphasizes the importance of having effective control measures. Until now, few reports have focused on *A. baumannii* in all geographical regions of Brazil, mainly descriptions of local outbreaks. This is the first study that attempt to determine the Brazilian countrywide spread of MDR *A. baumannii* harboring the *bla*_{OXA-23} gene in different regions of Brazil.

Acknowledgements

We thank platform Genotyping of Pathogens and Public Health (Institute Pasteur, Paris, France) for coding MLST alleles and profiles; and PDTIS-IOC DNA Sequencing Platform for DNA sequencing. We also thank the microbiologists who provided the strains from the Public Health Laboratories (LACENs): Ivoneide Barroso (Alagoas), Ana Lúcia de Souza (Amazonas), Celso Faria Junior (Distrito Federal), Hilda Ramos Ruf (Bahia), Maria da Penha Herkenhoff (Espírito Santo), Robmary de Almeida (Goiás), Carlene Alves (Minas Gerais), Maria Pia (Rio de Janeiro), Ana Karine da Silva Vale (Rio Grande do Norte) and Rita Bertoncini (Santa Catarina); and Marilene R. Chang (Univ. Fed. Mato Grosso do Sul/UFMS).

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and PAPES/Oswaldo Cruz Institute (IOC-FIOCRUZ).

References

Carvalho KR, Carvalho-Assef APD, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34:25-28.

Chaulagain BP, Jang SJ, Ahn GY, Ryu SY, Kim DM, Park G, et al. Molecular Epidemiology of an Outbreak of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Carrying the IS*Aba1*-*bla*_{OXA-51-like} Genes in a Korean Hospital. *Jpn J Infect Dis* 2012; 65:162-6.

Clímaco EC, Oliveira ML, Pitondo-Silva A, Oliveira MG, Medeiros M, Lincopan N, et al. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. *Infect Genet Evol* 2013; 19C:127-33.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement. Wayne, PA: CLSI; 2012.

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

Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE* 2010; 5: e10034.

Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrilli R. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries using a multilocus sequencing typing scheme. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:197-201.

Figueiredo S, Poirel L. Overexpression of the Naturally Occurring *bla*_{OXA-51} Gene in *Acinetobacter baumannii* Mediated by Novel Insertion Sequence IS_{Aba9}. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 52:4045-7.

Fiorilli G, Faccone D, Lopardo H, Callejo R, Rapoport M, Prieto M, et al. Emergence of metallo-beta-lactamases in *Acinetobacter* spp clinical isolates from Argentina. *Rev Esp Quimioter* 2010; 23:100-2.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73:354-60.

Gogou V, Pournaras S, Giannouli M, Voulgari E, Piperaki ET, Zarrilli R, et al. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). J Antimicrob Chemother 2011; 66:2767-72.

Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef AP, Asensi MD, et al. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? J Antimicrob Chemother 2011; 66:62-5.

Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. Microbiology 2009; 155:2333-41.

Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2010; 35:305-14.

Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. Drug Resist Updat 2012; 15:237-47.

Martins N, Martins IS, de Freitas WV, de Matos JA, Girão VB, Coelho-Souza T, et al. Imported and Intensive Care Unit-Born *Acinetobacter baumannii* Clonal Complexes: One-Year Prospective Cohort Study in Intensive Care Patients. Microb Drug Resist 2013; 19:216-23.

Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartique MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} gene. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:1257-63.

Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. J Clin Microbiol 2011; 49:718-21.

Pagano M, Martins AF, Machado AB, Barin J, Barth AL. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the IS_{Aba1} upstream *bla*_{OXA-51-like} gene in Porto Alegre, Southern Brazil. Epidemiol Infect 2013; 141:330-3.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21:538-82.

Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolysing β -lactamases and their genetic support. Curr Pharm Biotechnol 2005; 3:117-27.

Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006; 12:826-36.

Stietz MS, Ramírez MS, Vilacoba E, Merkier AK, Limansky AS, Centrón D, et al. *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I–III. Infect Genet Evol 2013; 14:294-301.

Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Piker R, Livermore DM, et al. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett 2006; 258:72-7.

Vanechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. J Clin Microbiol 1995; 33:11-5.

Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. J Clin Microbiol 2011; 49:875–82.

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

Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinteobacter baumannii* clonal lineages. Int J Antimicrob Agents 2013; 41:11-9.

Table 1. Molecular typing analysis and detection of IS*Aba1* of OXA-23-producing *A.baumannii* from different states in Brazil.

Genotype	Isolate	ST	Allelic profile	Complex Clonal (CC)	States	Year	IS <i>Aba1</i> - upstream <i>bla</i> _{OXA-51-like}	IS <i>Aba1</i> - upstream <i>bla</i> _{OXA-23-like}
Ab1	CCBH4902				RJ	2009	+	+
	CCBH4971				GO	2009	-	-
	CCBH5233				ES	2009	-	+
	CCBH5471	15	6-6-8-2-3-5-4	CC15	MS	2010	-	+
	CCBH5881				MG	2010	+	+
	CCBH6006				DF	2010	+	+
	CCBH6890				RN	2011	+	+
	CCBH6959				SC	2011	-	+
Ab2	CCBH5343	1	1-1-1-1-5-1-1	CC1	GO	2009	-	+
	CCBH5468				MS	2010	-	-
Ab3	CCBH4808				RJ	2008	+	+
	CCBH5791				MG	2010	+	+
	CCBH6009	79	26-2-2-29-4-5	CC79	DF	2010	+	+
	CCBH6872				ES	2010	-	+
	CCBH6887				RN	2011	-	+

AL, Alagoas; AM, Amazonas; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; SC, Santa Catarina.

Table 1. Molecular typing analysis and detection of IS*Aba1* of OXA-23-producing *A.baumannii* from different states in Brazil (Cont.)

Genotype	Isolate	ST	Allelic profile	Complex Clonal (CC)	States	Year	IS <i>Aba1</i> - upstream <i>bla</i> _{OXA-51-like}	IS <i>Aba1</i> - upstream <i>bla</i> _{OXA-23-like}
Ab4	CCBH4818				RJ	2008	+	+
	CCBH5231	79	26-2-2-29-4-5	CC79	ES	2009	-	+
	CCBH6554				AL	2010	-	+
Ab5	CCBH5164	107	34-35-37-1-5-6-36	--	ES	2009	-	-
Ab6	CCBH5405	188	1-3-6-1-3-4-4	--	RJ	2009	-	+
Ab7	CCBH5470	79	26-2-2-2-29-4-5	CC79	MS	2010	+	+
Ab8	CCBH4819	162	3-2-2-2-2-4-8	CC162	RJ	2008	-	+
Ab9	CCBH4900	162	3-2-2-2-2-4-8	CC162	RJ	2009	-	+
	CCBH5472				MS	2010	-	+
Ab10	CCBH5639	151	27-5-7-1-7-1-4	CC33	ES	2010	-	+
Ab11	CCBH5792	1	1-1-1-1-5-1-1	CC1	MG	2010	+	+
	CCBH6893				RN	2011	-	+
Ab12	CCBH5162	79	26-2-2-2-29-4-5	CC79	ES	2009	+	+
Ab14	CCBH5337	79	26-2-2-2-29-4-5	CC79	GO	2009	-	-

AL, Alagoas; AM, Amazonas; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; SC, Santa Catarina.

Table 1. Molecular typing analysis and detection of IS*Aba1* of OXA-23-producing *A.baumannii* from different states in Brazil (Cont.)

Genotype	Isolate	ST	Allelic profile	Complex Clonal (CC)	States	Year	IS <i>Aba1</i> - upstream <i>bla</i> _{OXA-51-like}	IS <i>Aba1</i> - upstream <i>bla</i> _{OXA-23-like}
Ab15	CCBH5338	1	1-1-1-1-5-1-1	CC1	GO	2009	+	-
Ab16	CCBH5642	79	26-2-2-2-29-4-5	CC79	ES	2010	+	+
Ab17	CCBH5036	317	3-1-15-2-40-4-4	--	ES	2009	-	+
Ab19	CCBH5054	25	3-3-2-4-7-2-4	CC25	AM	2009	-	-
Ab20	CCBH4816	316	3-1-6-2-4-1-5	--	RJ	2008	+	+
Ab21	CCBH4800	160	1-1-1-1-5-1-41	CC1	RJ	2008	+	+
Ab22	CCBH5361	79	26-2-2-2-29-4-5	CC79	ES	2009	+	+
Ab24	CCBH5790	318	6-6-8-2-3-5-5	CC15	MG	2010	+	+
Ab25	CCBH4825	316	3-1-6-2-4-1-5	--	RJ	2008	-	+
Ab26	CCBH5258	319	3-1-2-2-7-1-5	--	MG	2009	-	+
Ab27	CCBH5255	25	3-3-2-4-7-2-4	CC25	MG	2009	+	+
Ab28	CCBH4797	25	3-3-2-4-7-2-4	CC25	RJ	2008	-	+
Ab29	CCBH5475	25	3-3-2-4-7-2-4	CC25	MS	2010	+	+
Ab32	CCBH5218	318	6-6-8-2-3-5-5	CC15	MG	2009	+	+
Ab33	CCBH6558	15	6-6-8-2-3-5-4	CC15	AL	2010	+	+

AL, Alagoas; AM, Amazonas; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; SC, Santa Catarina.

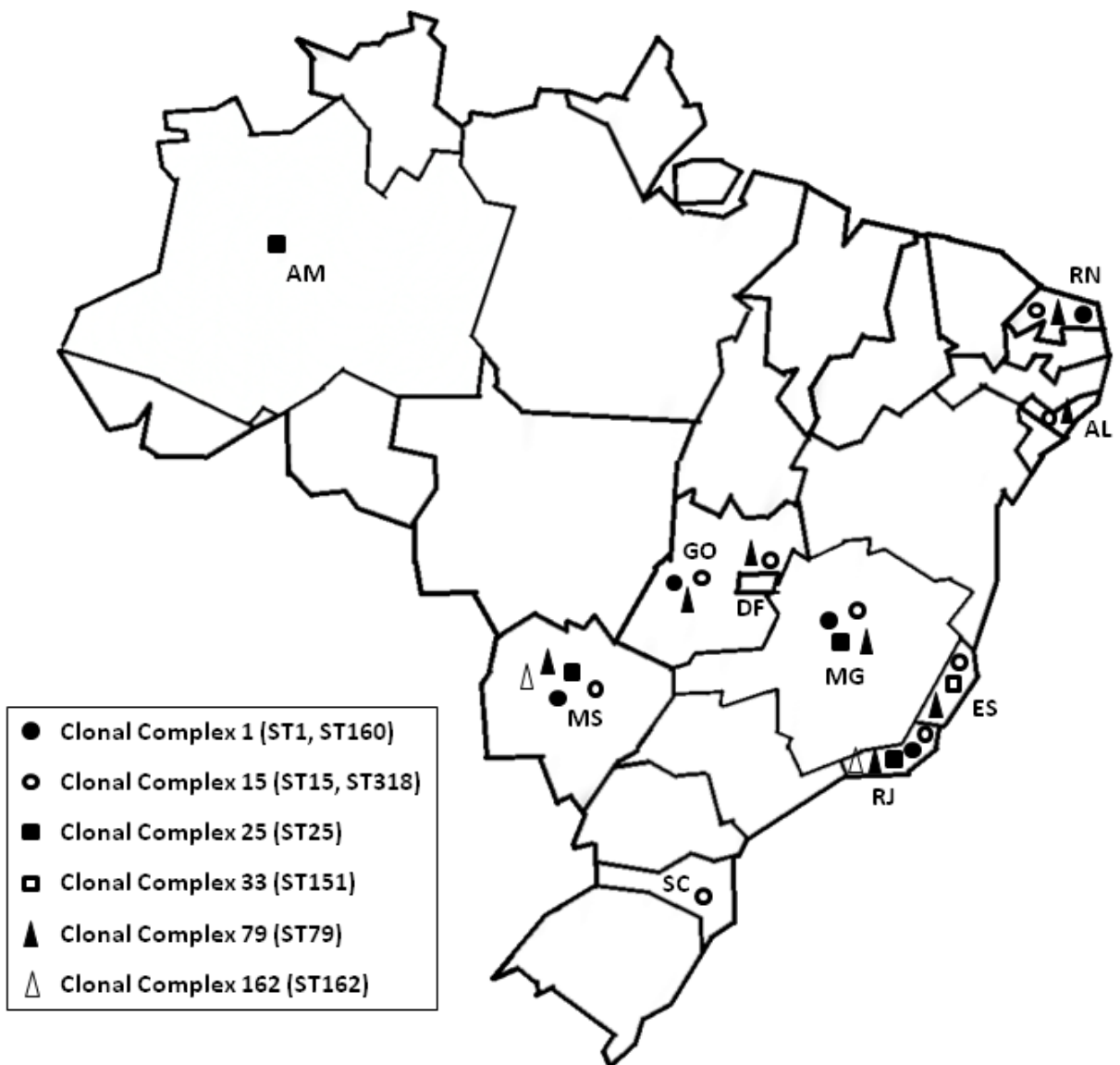


Fig. 2. Geographical distribution of CCs detected in different Brazilian states. AL, Alagoas; AM, Amazonas; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; SC, Santa Catarina.

3.2 Sequenciamento do genoma de uma cepa de *Acinetobacter baumannii* pertencente ao ST15 (complexo clonal CC15)

Article title: Draft Genome Sequence of a Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST15 (CC15) isolated from Brazil.

Author Names: Thiago Pavoni Gomes Chagas^{1/+}, Melise Chaves Silveira², Rodolpho M. Albano³, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef¹, Marise Dutra Asensi¹

¹ Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

+ Corresponding author: Thiago Pavoni Gomes Chagas
Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Brazil.

Email: thiagopavoni@gmail.com.

Tel: +552125621636; Fax: +552125621634.

Summary

Acinetobacter baumannii is an important pathogen frequently associated with nosocomial outbreaks around the world. In Brazil, *A. baumannii* has become particularly problematic because of its prevalence and the carbapenems resistance. Here, we report the draft genome sequence of a multidrug-resistant *A. baumannii* (ST15/CC15) isolated in 2009 from Espírito Santo State (South-east, Brazil). We observed important resistance determinant genes in an estimated genome size of 4.102.788 bp with 3.862 predicted coding regions. A detailed report of the genomic data analysis might help to understand the specific features of highly successful strains belonged to a relevant complex clonal in different Brazilian geographical regions.

Keywords: carbapenem-resistance, OXA-23, *Acinetobacter baumannii*, Brazil, genome sequence.

Financial support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Oswaldo Cruz Institute (PAPES-FIOCRUZ).

Acinetobacter baumannii is an important Gram-negative pathogen frequently associated with nosocomial outbreaks worldwide and highly capable of surviving and spreading in the hospital environment. This pathogen may present high rates of multi-drug resistance including aminoglycosides and fluoroquinolones. Carbapenems usually have good potency against *A. baumannii*, but carbapenem resistance has been increasingly reported in several countries during the last decade (Migliavacca et al., 2013). Carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases of the oxacilinases are the most important cause of carbapenem resistance in *A. baumannii* around the world (Zarrilli et al., 2013).

In Brazil, *A. baumannii* has become particularly problematic because of its prevalence and the carbapenems resistance, usually related to oxacilinases, mostly involving OXA-23 producers (Carvalho et al., 2009). Previous study reported the dissemination of two major clusters, Clonal Complexes (CC) 15 and 79, of Multidrug-resistant *A. baumannii* in different Brazilian states harboring *bla*_{OXA-23} gene. The CC15 was described in nine Brazilian states (Alagoas, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Santa Catarina and Mato Grosso do Sul) belonging to the 4 different geographical regions of the country (Chagas et al., 2014).

This report announces the draft genome sequence of *A. baumannii* CCBH5233 isolated in 2009 from a hospitalized patient in the Espírito Santo State (South-east, Brazil) and deposited in the Culture Collection of Hospital-Acquired Bacteria (CCBH) located at the Hospital Infection Research Laboratory (Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz). This strain displayed a multidrug resistance profile, which included resistance to ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam, ampicillin/sulbactam, ceftazidime, cefepime, amikacin, sulfamethoxazole-trimethoprim, meropenem and imipenem, with the exception of polymyxin B. According to polymerase chain reaction (PCR) analysis (Higgins et al., 2013), *A. baumannii* CCBH5233 has *bla*_{OXA-51-like}, originally intrinsic to *A. baumannii*, and *bla*_{OXA-23-like} genes. Previous Multilocus Sequence Typing (MLST) analysis (Diancourt et al., 2010) showed that the strain belongs to sequence type (ST) 15/CC15 (according to MLST scheme developed by Pasteur Institute) (Chagas et al., 2014).

Genomic DNA was extracted using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany) and sequenced using an Illumina MiSeq sequencing platform (Illumina Inc., USA). A genomic library was constructed by transposon tagmentation with the Nextera XT DNA Sample Prep kit (Illumina Inc, USA). The data were filtered and trimmed to a Phred score of > 20 and were assembled de novo using the Velvet algorithms (Zerbino et al., 2008). Seventy-six contigs were generated and genome annotation was performed on the Rapid Annotation using System Technology (RAST) v.2.0 (available at <https://rast.nmpdr.org/>). By RAST, 3.862 coding sequences were annotated from the genome with estimated size of 4.102.788 bp. According to tRNAScan-SE (Schattner et al., 2005) and RNAmmer (Lagesen et al., 2007) analysis, we identified 66 tRNAs and 8 rRNAs respectively. *A. baumannii* contigs were analyzed using ResFinder 2.1 (available at <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) which identifies acquired antimicrobial resistance genes in total or partial sequenced isolates of bacteria (Zankari et al., 2012). Using this approach, we observed resistance genes to beta-lactams (*bla*_{OXA-51} [LAXF01000004; 277103-277927bp], *bla*_{OXA-23} [LAXF01000049; 9858-10679bp] and *bla*_{TEM-1} [LAXF01000047; 5481-6341bp]), to aminoglycosides (*aphA(6)* [LAXF01000061; 273-1052bp] and *aac(3)-IIa* [LAXF01000047; 4538-5339bp]) and to sulphonamide (*sul2* [LAXF01000056; 2580-3395bp]).

In order to confirm the result obtained by traditional PCR-based Multilocus sequence typing, *A. baumannii* contigs were analyzed by MLST 1.7 server of Center for Genetic Epidemiology (available at <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) (Larsen et al., 2012). The MLST 1.7 results showed that CCBH5233 belongs to ST15/CC15 (MLST scheme developed by Pasteur Institute) and ST236/CC104 (MLST scheme developed by University of Oxford). Additional molecular typing was performed using *Acinetobacter baumannii* Sequence Typing server (available at http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/AB/ab_type1.php) by searching and comparing the regions of *ompA*, *csuE* and *bla*_{OXA-51} (Turton et al., 2007). Using this additional typing, our strain was defined as sequence type 502.

In summary, we reported whole-genome sequencing of the *A. baumannii* ST15 (CC15) harboring *bla*_{OXA-23} and a detailed genomic analysis will be provided in future studies. In the context of resistance characteristics, genes relevant to *Acinetobacter* could be identified by WGS approaches. A detailed report of the genomic data analysis might help to understand the specific features of successful strains belonging to an important complex clonal in Brazil.

This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession LAXF00000000. The version described in this paper is version LAXF01000000.

References

Carvalho KR, Carvalho-Assef APD, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD 2009. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 34: 25–28.

Chagas TP, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef AP, Asensi MD 2014. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis* 79: 468-472.

Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE* 5: e10034.

Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. 2013. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2121-2126.

Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Staerfeldt HH, Rognes T, Ussery DW 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* 35: 3100–3108.

Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O 2012. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 50: 1355-1361.

Migliavacca R, Espinal P, Principe L, Drago M, Fugazza G, Roca I, Nucleo E, Bracco S, Vila J, Pagani L, Luzzaro F 2013. Characterization of resistance mechanisms and genetic relatedness of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from blood, Italy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75: 180–186.

Schattner P, Brooks AN, Lowe TM 2005. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucleic Acids Res* 33: W686-689.

Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL 2007. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 13: 807-815.

Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67: 2640-2644.

Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 41: 11–19.

Zerbino DR, Birney E 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 18: 821–829.

3.3 Detecção de *Acinetobacter bereziniae* produtor de NDM no Brasil

Article title: Detection of NDM-1-Producing *Acinetobacter bereziniae* strain in Brazil

Author names: Thiago Pavoni Gomes Chagas^a, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef^a, Caio Augusto Martins Aires^a, Rita Bertocini^b, Marise Dutra Asensi^{a*}

^a Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^b Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC), SC, Brazil.

* Corresponding author: Marise Dutra Asensi

Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar - LAPIH - IOC (Oswaldo Cruz Institute) – FIOCRUZ, Brazil. E-mail address: marise@ioc.fiocruz.br Tel: +552125621636. Fax: +552125621634

Sir,

NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) was first reported in *K. pneumoniae* and *Escherichia coli* in 2009 [1]. Since then, *bla*_{NDM}-positive bacteria have been disseminated worldwide. In *Acinetobacter*, the *bla*_{NDM} gene was identified in different regions of the world, such as India, China, Egypt, France and Paraguay [2]. In Brazil, the first case of NDM in *Acinetobacter* was reported in 2014 in *A. baumannii* from State of Paraná (Southern Brazil) [2]. Here, we report (to our knowledge) the first description of NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* in Brazil (South America).

Acinetobacter bereziniae, previously known as *Acinetobacter* genomic species 10, has been responsible for health care-associated infections and has been isolated more rarely from various other sources, including soil, animals and vegetables [3]. Until now, Carbapenem-resistant *A. bereziniae* carrying *bla*_{NDM} has been reported only in Asia (China, India, and Pakistan) [4,5].

In this study, a Carbapenem-resistant *A. bereziniae* was recovered from a blood sample of a 21-year-old-man hospitalized patient admitted in a hospital from State of Santa Catarina, Southern Brazil, in April 2014. The *Acinetobacter* strain was previously identified according to conventional biochemical tests, morphological and growth characteristics and 16S rRNA gene sequencing. The final species identification was performed by *rpoB* gene sequencing analysis. According

susceptibility tests conducted using agar diffusion method and E-test® (Biomeriux) and interpreted according to CLSI guideline [6], we observed a multidrug resistance profile, which included resistance to ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam, ceftazidime, cefepime, amikacin, sulfamethoxazole-trimethoprim, ertapenem (MIC > 32 µg/mL), meropenem (MIC > 32 µg/mL) and imipenem (MIC > 32 µg/mL). It was susceptible for polymyxin B with MIC = 0.50 µg/mL. Screening test for metallo-beta-lactamase production showed a positive result with imipenem/EDTA [7].

OXA-like carbapenemases, the most widespread mechanism resulting in carbapenem resistance in *Acinetobacter* spp. (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like} and *bla*_{OXA-235-like}), were not detected by multiplex PCR. PCR screening for other carbapenemase genes (*bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{SPM}) followed by DNA sequencing showed the presence of *bla*_{NDM-1}. To identify the location of this gene, we performed plasmid analysis by alkaline lysis methodology and Southern blot hybridizations with digoxigenin-labelled probes of resistance gene found generated by the PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics). The *bla*_{NDM-1}-carrying plasmid observed was approximately 41 kb, similar to the *bla*_{NDM-1}-carrying plasmids in *Acinetobacter* strains isolated from Asia (30–55 kb) [4, 5], but smaller than the *bla*_{NDM-1}-carrying plasmid described in *A. baumannii* isolated from Brazil [2]. *A. baumannii* was the most common NDM-1-producing *Acinetobacter* spp. and the *bla*_{NDM-1} gene was mostly chromosome located [8]. However, NDM-producing *Acinetobacter* isolates have been recently reported in *bla*_{NDM} gene-bearing plasmids [2, 4-5, 8].

To obtain a comprehensive view of the genetic context of *bla*_{NDM-1}, *A. bereziniae* genomic sequence was performed on an Illumina HiSeq system. Contigs obtained with Velvet algorithms were used for Blast searches against GenBank. Genetic environment of *bla*_{NDM-1} has been observed very similar to previously described in NDM-producing *A. haemolyticus* (JQ080305.2) isolated from China [4]. The *bla*_{NDM-1} gene was located inside a type I transposon *Tn125*. This type of transposon is common in *Acinetobacter* species, including *A. junii*, *A. haemolyticus*, *A. baumannii*, *A. johnsonii* and *A.* genomic species 15TU, and contained an integral *Tn125* structure (*ISAb125-bla*_{NDM-1}-*bleo-trpF-dsbc-cutA1-groES-groEL-ISCR27-ISAb125*) [4].

For additional screening of other antibiotic resistance genes, the *A. bereziniae* contigs were submitted to the ResFinder database (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), with a 98% threshold for identification of genes. It allowed us to identify

aminoglycoside resistance genes (*strA*, *aphA6*, *aadB* and *strB*) and tetracycline resistance genes (*tetA*). Considering beta-lactamases encoding genes, we also observed *bla*_{OXA-229}, a variant of the intrinsic OXA-228-like. Carbapenem resistance in *A. bereziniae* has also previously been associated with the metallo-beta-lactamases IMP, SIM and VIM or overexpression of class D β -lactamases (OXA-228-like) [3].

Reports of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. carrying *bla*_{NDM} are increasing worldwide. In summary, we showed an association of this gene with *Acinetobacter bereziniae*, a species which is rarely found in human clinical specimens. Our detection of NDM in non-baumannii *Acinetobacter* spp. and its plasmid environment (IS*Aba*125-associated transposon) suggests that this species may serve as a reservoir for transferring NDM-1 and other resistance genes to other bacterial species as *Enterobacteriaceae*.

(This report was presented in part at the 4th Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica [International Symposium of Clinical Microbiology], Paraíba State, Brazil, 2014 [Abstract/Poster 197-1]).

Acknowledgements

We thank PDTIS and High-throughput Platform (Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz) for DNA sequencing.

Declarations

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Oswaldo Cruz Institute (PAPES-FIOCRUZ).

Competing interests: None to declare.

Ethical approval: Not required.

References

[1] Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella*

pneumoniae sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5046-54.

[2] Pillionetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TPG, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. 2014. First Report of NDM-1-Producing *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 7592-7594.

[3] Zander E, Seifert H, Higgins PG. 2014. Insertion sequence IS18 mediates overexpression of *bla*_{OXA-257} in a carbapenem-resistant *Acinetobacter bereziniae* isolate. *J Antimicrob Chemother* 69: 270-271.

[4] Fu Y, Liu L, Li X, Chen Y, Jiang Y, Wang Y, Yu Y, Xie X. 2015. Spread of a common *bla*_{NDM-1}-carrying plasmid among diverse *Acinetobacter* species. *Infect Genet Evol* 32: 30-33.

[5] Jones LS, Carvalho MJ, Toleman MA, White PL, Connor TR, Mushtaq A, Weeks JL, Kumarasamy KK, Raven KE, Török ME, Peacock SJ, Howe RA, Walsh TR. 2015. Characterization of Plasmids in Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter* Strains Isolated in India and Pakistan. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 923-929.

[6] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24. CLSI, Wayne, PA, USA, 2014.

[7] Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P. 2012. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo- β -lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 50: 1419–1421.

[8] Yang J, Chen Y, Jia X, Luo Y, Song Q, Zhao W, Wang Y, Liu H, Zheng D, Xia Y, Yu R, Han X, Jiang G, Zhou Y, Zhou W, Hu X, Liang L, Han L. 2012. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin Microbiol Infect* 18: E506-13.

3.4 Discussão geral

Nos últimos anos, pode ser observado um aumento da prevalência das infecções hospitalares em diversos sítios e o impacto clínico dessas infecções foi facilmente percebido, já que os pacientes ficam mais tempo hospitalizados, utilizando antimicrobianos de amplo espectro, muitas vezes, em unidades de tratamento intensivo (DIJKSHOORN *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2008). Como já mencionado, *Acinetobacter* spp. apresenta resistência intrínseca a vários antibióticos, assim como a facilidade em acumular mecanismos de resistência e habilidade de sobreviver por longos períodos em superfícies inanimadas. Com isso, a determinação de sua presença no ambiente hospitalar bem como sua caracterização e a dos seus mecanismos de resistência são de grande importância, já que este microrganismo está associado a diversos surtos no Brasil e no mundo (LEVIN *et al.*, 1996; VAN DEN BROEK *et al.*, 2006; YOUNG *et al.*, 2007; VALENZUELA *et al.*, 2007; VALENTINE *et al.*, 2008). A presente tese reuniu três artigos resultantes da caracterização fenotípica e molecular de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. (*A. baumannii* e *A. bereziniae*) da Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse Hospitalar e provenientes de hospitais de diferentes estados brasileiros.

Em 2010, Grosso e colaboradores investigaram isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23 do Rio Janeiro também pertencentes à Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse Hospitalar; e, a partir da análise da estrutura populacional bacteriana, identificaram um grupo clonal prevalente no estado pertencente ao ST79 (GROSSO *et al.*, 2010). Motivados por estes resultados e na busca de ampliá-los a nível nacional, foram selecionados 155 isolados bacterianos do período entre 2008 e 2011. Os perfis de resistência e a tipagem molecular foram determinados e avaliados. Taxas significativas de resistência foram observadas, superando 90% para a maioria das drogas testadas, especialmente, os beta-lactâmicos do tipo carbapenêmicos.

Todos os isolados bacterianos incluídos no trabalho foram multirresistentes, sugerindo um problema terapêutico de grande preocupação, que pode afetar a evolução clínica de infecções graves causadas por esses patógenos. Nos últimos anos, *Acinetobacter* spp. tem sido comumente relatado como resistentes a múltiplas drogas e as taxas de resistência ao imipenem, ao meropenem, à ceftazidima, à piperacilina/tazobactam, à ciprofloxacina e à gentamicina na América Latina

parecem estar entre as maiores do mundo (PELEG *et al.*, 2008). Casos de *A. baumannii* multirresistentes tem sido relatados com frequência em alguns países da América do Sul, como Argentina, Bolívia, Brasil e Colômbia (VILLEGAS *et al.*, 2007; FIORILLI *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2013). Particularmente para os carbapênemicos, as taxas de resistência descritas, no artigo apresentado, foram 95.5% e 94.2% para imipenem e meropenem, respectivamente. De acordo com os dados do SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program) na América Latina, taxas de resistência ao imipenem aumentaram de 6,4%, 12,6%, e 0,0% em 1997-1999 para 84,9%, 71,4% e 50,0% em 2008-2010, na Argentina, no Brasil e no Chile respectivamente (GALES *et al.*, 2012).

Outros estudos brasileiros também apontam um aumento da resistência aos carbapenêmicos nos hospitais do país e tal resultado é explicado pelo uso de antimicrobianos de amplo espectro em tratamentos de diferentes síndromes infecciosas por bactérias multirresistentes, principalmente, após a emergência daquelas produtoras de beta-lactamases de espectro ampliado, onde o aumento do uso de carbapenêmicos tornou-se necessário, exercendo uma pressão seletiva sobre as carbapenemases (ZARRILI *et al.*, 2004; SADER *et al.*, 2005; NORDMANN *et al.*, 2009). Em um recente estudo em um hospital universitário de São Paulo, Oliveira e colaboradores (2015) observaram, entre 3.410 isolados de *Acinetobacter* spp., um aumento progressivo na resistência aos carbapenêmicos de 7.4% para 57.5% entre os anos de 1999 e 2008; e, concomitantemente, houve um aumento do consumo desta classe de drogas (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

O atual aumento do número de infecções causadas por bactérias Gram-negativas, especialmente, *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos tem levado ao uso de polimixina para o tratamento (CARVALHO *et al.*, 2009). Nos resultados aqui apresentados, é possível observar que os isolados apresentaram sensibilidade a este grupo de antimicrobianos. A polimixina foi introduzida no início de 1980 para tratar infecções causadas por bacilos Gram-negativos e, apesar de ser uma droga altamente tóxica, está sendo voltando a ser utilizada para tratamento de isolados de *Acinetobacter* sensíveis a esta droga. (CARVALHO *et al.*, 2009). No entanto, a resistência a este grupo de antimicrobianos já vem sendo observada (RUPPÉ *et al.*, 2015; CAI *et al.*, 2012).

A partir dos resultados apresentados, observou-se que a resistência aos carbapenêmicos foi mediada pela enzima OXA-23, uma vez que o gene *bla*_{OXA-23-like} foi detectado na maioria (94.2%) dos isolados de *A. baumannii*, cujos MIC tanto para

imipenem quanto para meropenem foram maiores que 32 µg/mL, confirmando vários relatos de surtos de *A. baumannii* com tal mecanismo de resistência publicados no país (CARVALHO *et al.*, 2009). Segundo Evans e Aymes (2014), as bactérias não necessitam de outros mecanismos de resistência, para trabalhar em sinergia com OXA-23, para elas se tornarem resistentes aos carbapenêmicos, embora altos níveis de resistência são alcançados quando há outros mecanismos presentes. As oxacilinae do grupo OXA-23 são capazes de hidrolisar aminopenicilinas, piperacilina, oxacilina, aztreonam além dos carbapenêmicos (AFZAL-SHAH *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2013). Entre estas últimas drogas, OXA-23-like parece ter uma taxa de hidrólise muito maior para imipenem do que para meropenem, ertapenem ou doripenem (PATON *et al.*, 1993).

A disseminação de *bla*_{OXA-23-like} observada entre os isolados do período estudado (2008-2011) também parece ainda persistir no cenário brasileiro em momentos atuais. Em um recente estudo, OXA-23 foi a mais frequente carbapenemase do tipo OXA encontrada entre isolados de *A. baumannii* recuperados de cinco estados representativos do país (VASCONCELOS *et al.*, 2015). De acordo com Clímaco *et al.*, (2013), a disseminação de OXA-23 ocorre, provavelmente, devido a associação do gene *bla*_{OXA-23-like} com elementos genéticos móveis (isto é, plasmídeos, transposons e sequências de inserção). Em um estudo anterior, *bla*_{OXA-23-like} foi associado ao transposon *Tn2006*, no cromossomo de todos os isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem no Rio de Janeiro (GROSSO *et al.*, 2011). Em 2010, Mugnier e colaboradores descreveram a disseminação de OXA-23 em vinte isolados de *A. baumannii* provenientes de 15 países, incluindo um isolado oriundo do Brasil. A localização do gene *bla*_{OXA-23} nos isolados foi observada tanto no DNA cromossomal quanto no DNA plasmidial, e estes genes estavam associados a *ISAb1* e a três plataformas gênicas *Tn2006*, *Tn2007* e *Tn2008*. No caso do isolado brasileiro, o gene foi localizado em um plasmídio de peso molecular de 130 kb e, a montante de *bla*_{OXA-23}, foi encontrada uma cópia de *ISAb1* (MUGNIER *et al.*, 2010).

Os resultados apresentados também indicaram que alguns isolados carregavam o gene *bla*_{OXA-23-like} com o *ISAb1* e estes dados parecem estar de acordo com os de outros estudos já publicados. Como anteriormente descrito por trabalhos europeus e brasileiros (PAGANO *et al.*, 2013), o grau de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* pode ser acentuado pela presença de sequências de promotores fornecidos por *ISAb1*, levando à hiperexpressão de OXA-23.

Nenhum outro subgrupo de carbapenemase do tipo OXA, com exceção de OXA-51-like, foi detectado entre os isolados de *A. baumannii* apesar da circulação destas enzimas no país no período aqui estudado (FIGUEIREDO *et al.*, 2011; WERNECK *et al.*, 2011).

Com relação aos isolados não produtores de OXA-23, foram encontrados cinco isolados resistentes aos carbapenêmicos e estes resultados podem ser explicados pela presença do elemento IS*Aba1* a montante do gene *bla*_{OXA-51-like}. Como relatado por outros autores, a suscetibilidade reduzida aos carbapenêmicos em isolados não-OXA-23 pode ser mediada pelo gene *bla*_{OXA-51-like}, que, normalmente, é pouco expresso. No entanto, a presença da sequência de inserção IS*Aba1* ou IS*Aba9* é necessária para a expressão aumentada associada a outros mecanismos, tais como a redução da permeabilidade da membrana externa ou hiperexpressão de bombas de efluxo (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

No mundo, estudos epidemiológico com ferramentas moleculares têm demonstrado que a disseminação de *bla*_{OXA-23} tem sido associada à clones específicos. Os estudos epidemiológicos moleculares são fundamentais para a detecção das principais bactérias, particularmente, *Acinetobacter* spp., associadas às infecções hospitalares, e para a compreensão dos seus mecanismos de resistência a fim de implementar diretrizes preventivas de sua disseminação (SINGH *et al.*, 2006). Aqui, foram utilizadas duas técnicas moleculares, PFGE e MLST, para avaliar o polimorfismo e a relação de clonalidade dos isolados de *A. baumannii*. Atualmente, existem dois esquemas de MLST para *A. baumannii*: o primeiro desenvolvido por Bartual e colaboradores (2005), também conhecido como esquema da Universidade de Oxford; e o segundo por Diancourt e colaboradores (2010), comumente conhecido como esquema do Instituto Pasteur. O presente trabalho utilizou o segundo esquema.

Entre os isolados bacterianos produtores de OXA-23, 28 genótipos foram caracterizados através do PFGE, que, por sua vez, foram agrupados, a partir do MLST, em 13 STs. Tal como observado em estudos anteriormente, os nossos resultados são consistentes com o fato do PFGE ser mais discriminatório que o MLST, uma vez que PFGE pode detectar rearranjos cromossomais. Em contraste, MLST é mais apropriado para filogenia e epidemiologia de larga escala. Cepas pertencentes ao mesmo ST nem sempre se agrupam em um mesmo agrupamento de padrões por PFGE. De acordo com a Johnson e colaboradores (2007), o PFGE é capaz de melhor detectar as alterações no material genético do microrganismo do

que o MLST. Contudo, PFGE e MLST podem ser considerados métodos complementares, sendo apropriadas para estudos em escalas distintas: epidemiologia local e estrutura da população mundial, respectivamente (NEMOY *et al.*, 2005; JOHNSON *et al.*, 2007; VILLALÓN *et al.*, 2011).

O genótipo, obtido pelo PFGE, mais prevalente Ab1 (n=58 amostras) e outros genótipos (Ab24, Ab32 e Ab33) foram agrupados, pelo MLST, no CC15, observado em quatro regiões do Brasil. Segundo Diancourt *et al.* (2010), isolados de *A. baumannii* pertencentes ao ST15, fundador do CC15, demonstraram certo sucesso evolutivo e apresentam, universalmente, fenótipos de multirresistência, o que facilitou a sua rápida expansão clonal nos últimos anos. Este complexo já foi identificado em vários países, principalmente europeus e sulamericanos, incluindo a Itália, Espanha, Grécia, Turquia, Noruega, Portugal, República Checa, Holanda, Argentina e Brasil (DI POPOLO *et al.*, 2011, GOGOU *et al.*, 2011 e VILLALON *et al.*, 2011).

Na América Latina, *A. baumannii* produtores de OXA-23 tem sido comumente relatados como pertencentes ao CC79 (GROSSO *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2013; STIETZ *et al.*, 2013). Neste trabalho, CC79 foi encontrado em oito estados brasileiros, representando o segundo maior complexo clonal no país, seguido por CC1 detectado em 5 estados. Este complexo CC1 é designado como o segundo maior complexo clonal de *A. baumannii* no mundo com uma ampla distribuição internacional, incluindo Itália, Noruega, Reino Unido Croácia, República Checa, Irlanda, Suíça, Espanha, França, Grécia, Holanda, Turquia, Índia, China, Japão, África do Sul, Singapura, Líbia, Argentina, EUA e Austrália (KARAH *et al.*, 2012).

Estudos anteriores, baseados em análises locais ou regionais, já destacavam o ST79 (CC79) e o ST15 (CC15) em alguns estados do país. No Rio de Janeiro, CC15 e CC79 já foram identificados em *A. baumannii* isolados nos anos 2006 e 2007 (MARTINS *et al.*, 2013; GROSSO *et al.*, 2011). Em 2013, Clímaco e colaboradores, detectaram estes complexos clonais entre 74 isolados de *A. baumannii* de São Paulo e Minas Gerais. Em Salvador, Bahia, Coelho-Souza e colaboradores (2013) também reportam *A. baumannii* pertencentes aos complexos CC15 e CC79 associados a casos de meningite. O presente estudo, evidencia-se que estes complexos clonais portadores de *bla*_{OXA-23-like} também disseminaram-se no país ao longo dos últimos 3 anos, ilustrando o sucesso destes microrganismos. E isso parece se manter, pois Vasconcelos e colaboradores (2015) identificaram os mesmos complexos no Distrito Federal, Rio Grande do Sul, São Paulo e Pará.

Os isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23, descritos no trabalho, apresentaram taxa de resistência a outros antimicrobianos (como amicacina, ciprofloxacina e sulfametoxazol/trimetoprim) , que não estão incluídos no espectro hidrolítico da oxacilinase, indicando que, possivelmente, também tenha ocorrido a disseminação de outros determinantes de resistência, não investigados no presente trabalho. Assim, estudos complementares seriam necessários para a detecção destes determinantes e sua associação com o fenômeno de multirresistência.

Após caracterizar os isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-23, identificando os grupos clonais que circulam no país, foi selecionado um isolado pertencente ao ST15 (CC15) para o sequenciamento de alta vazão. A grande vantagem deste tipo de tecnologia para sequenciamento usada, é que ela permite a produção de um número muito grande de dados, sequenciando milhões de fragmentos de DNA em paralelo, com uma única corrida (LIU *et al.*, 2012).

Não foi possível montar o genoma completo com as estratégias de montagem utilizadas e apenas as características relacionadas à resistência aos antimicrobianos foram exploradas. Foi possível detectar além de *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}, também previamente já identificados por PCR convencional, outros genes de resistência: *bla*_{TEM-1} (resistência aos beta-lactâmicos); *aphA(6)* e *aac(3)-IIa* (resistência aos aminoglicosídeos); e *sul2* (resistência as sulfonamidas). Estes resultados poderiam ajudar a explicar o questionamento anterior sobre a multirresistência nos isolados bacterianos. No entanto, o trabalho limita-se a apenas uma cepa representativa de um dos grandes complexos clonais do país. Além disso, estudos complementares são necessários para melhor caracterizar estes genes e seu ambiente genético.

A partir dos dados gerados pelo sequenciamento de alta vazão, ainda foi possível, realizar tipagem molecular adicional e o isolado confirmou-se pertencer ao ST15 (CC15) e ao equivalente ST236 (CC104) do esquema de MLST da Universidade de Oxford. Uma abordagem mais detalhada na análise dos dados genéticos gerados poderá ajudar a compreender as características específicas de cepas de sucesso pertencentes a uma importante complexo clonal no Brasil. Segundo Zarrilli e colaboradores (2013), análises genômicas com tecnologias de WGS têm sido utilizadas com cada vez mais frequência para análises epidemiológicas e da diversidade genética das populações bacterianas (ZARRILLI *et al.*, 2013).

Acompanhando a emergência da metalo-beta-lactamase NDM no Brasil e no mundo (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2014; DORTET *et al.*, 2014), foi incluído no

estudo um isolado de *A. bereziniae* produtor de NDM proveniente de Santa Catarina. Esta espécie é uma das várias do gênero dificilmente associada a casos clínicos, mas quando associadas, estão restritas, principalmente, às infecções da corrente sanguínea relacionadas ao cateter (VISCA *et al.*, 2011). Tais dados parecem ir ao encontro às informações apresentadas nesse trabalho, uma vez que o isolado bacteriano foi obtido de hemocultura. A espécie também pode ser isolada de fontes ambientais, incluindo vegetais, animais e solo (ZANDER *et al.*, 2014).

A resistência aos antimicrobianos é raramente relatada na espécie e os poucos relatos de resistência aos carbapenêmicos estão associados à metalo-beta-lactamases dos tipos IMP, SIM e VIM ou hiperexpressão da oxacilinase OXA-228-like, intrínseca a espécie (BONNIN *et al.*, 2012; ZANDER *et al.*, 2014). Park e colaboradores relataram, em 2012, entre diferentes espécies de *Acinetobacter*, isolados de *A. bereziniae* produtores de IMP-1. Em 2013, Yamamoto e colaboradores (2013) relataram 9 isolados de *A. bereziniae* portadores de *bla*_{IMP-19}, proveninetes do Japão, resistentes a piperacilina, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem e sulfametoxazol-trimetoprim.

Até esta descrição, *A. bereziniae* carreando *bla*_{NDM} tinha sido relatada somente na Ásia (China, Índia). Na China, *A. bereziniae* positivo para *bla*_{NDM-1} foi publicado em 2012 a partir de isolados do período 2009-2010 (FU *et al.*, 2012). Jones e colaboradores publicaram, em 2015, *A. bereziniae* produtor de NDM proveniente da Índia isolado no ano de 2005. Mais recentemente, após a descrição brasileira, Brovedan e colaboradores descreveram *A. bereziniae* produtor de NDM isolado em junho de 2014 a partir de uma amostra de sangue de um paciente do sexo feminino que foi submetido a tratamento de quimioterapia num hospital localizado em Rosario, Argentina (BROVEDAN *et al.*, 2015).

No Brasil, entre as espécies do gênero, além de *A. bereziniae*, NDM foi descrito apenas em *A. pittii* e *A. baumannii*, sendo este último a primeira descrição no país (PILLONETTO *et al.*, 2014; PAGANO *et al.*, 2015). *A. baumannii* produtor de NDM foi isolado em 2013 de um paciente de Londrina, Santa Catarina (PILLONETTO *et al.*, 2014). No caso de *A. pittii*, este foi isolado também em 2013 em um hospital de Porto Alegre (PAGANO *et al.*, 2015). A partir do relato aqui apresentado e dos demais publicados, pode-se apontar que NDM ainda está restrito no sul do país no contexto das espécies de *Acinetobacter*. Este fato coincide com a epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtoras da mesma MBL no país. No Brasil, a enzima NDM foi descrita pela primeira vez, em 2013, em *P. rettgeri* isolada de um

paciente do Rio Grande do Sul pouco tempo depois da publicação da descrição no país-fronteira Uruguai também na mesma espécie (OMS, 2012; CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013). No entanto, um estudo retrospectivo sugeriu que isolados de *Enterobacter* spp. produtores de NDM estariam circulando no estado desde 2012 (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2014).

Embora na maioria dos casos, os genes de NDM sejam encontrados em *Enterobacteriaceae*, relatos em espécies de *Acinetobacter*, principalmente, não-*baumannii* têm aumentado. Entre as espécies de *Acinetobacter*, cuja enzima já foi descrita, incluem: *A. junii*, *A. haemolyticus*, *A. baumannii*, *A. johnsonii*, *A. pittii*, *A. soli*, *A. guillouiae*, *A. Iwoffii* e *A. beijerinckii* (BOŠNJAK *et al.*, 2014; FU *et al.*, 2015; SUNG *et al.*, 2015; QUIÑONES *et al.*, 2015). Estudos anteriores demonstraram que *A. baumannii* pode ter sido o progenitor para a evolução de *bla*_{NDM-1} e sugerem que as espécies de *Acinetobacter* servem como um reservatório no processo de transferência horizontal entre agentes patogênicos ambientais e espécies de enterobactérias (DORTET *et al.*, 2014).

Em *Acinetobacter*, o gene *bla*_{NDM-1} foi, originalmente localizado no cromossomo (YANG *et al.*, 2012). Porém, isolados do gênero têm sido relatados recentemente com plasmídeos portadores do gene (YANG *et al.*, 2012; PILLONETTO *et al.*, 2014; FU *et al.*, 2015; JONES *et al.*, 2015). Baseado nessas descrições anteriores, para tentar elucidar a localização genética do gene, foi realizado a extração plasmidial por lise alcalina e hibridação. Assim, foi possível detectar o gene *bla*_{NDM-1} em um plasmídeo de aproximadamente 41 kb, semelhante ao que foi observado em cepas de *Acinetobacter* isoladas na Ásia (30-55 kb) (FU *et al.*, 2015; JONES *et al.*, 2015). No entanto, foi menor do que o plasmídeo descrito em *A. baumannii* isolado no Brasil (PILLONETTO *et al.*, 2014). No caso de *A. pittii* isolado no país, o gene foi sugerido com localização cromossomal.

Para maiores esclarecimentos, o isolado de *A. bereziniae* também foi selecionado para o sequenciamento de alta vazão. As estratégias foram as mesmas utilizadas para o isolado de *A. baumannii* e, como no caso anterior, o genoma não foi montado por completo. No entanto, foi possível visualizar um pouco mais do contexto genético onde *bla*_{NDM-1} estava inserido. Com relação a esse ambiente genético, *bla*_{NDM-1} encontrava-se em um transposon da família Tn125 do tipo 1. Este tipo de transposon é muito comum em espécies de *Acinetobacter*, incluindo *Acinetobacter junii*, *A. haemolyticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter johnsonii* e *Acinetobacter* espécies genômicas 15TU (FU *et al.*, 2015). Segundo Poirel e

colaboradores (2012), ao contrario do que acontece para as enterobactérias, a atual disseminação de *bla*_{NDM}, entre *Acinetobacter*, está associada ao Tn125, que, neste caso, é constituído por duas cópias de *ISAb*125, responsáveis pela mobilização do transposon (POIREL *et al.*, 2012).

Com os dados gerados no sequenciamento, também foi possível investigar outros determinantes de resistência em *A. bereziniae*: genes de resistência aos aminoglicosídeos (*strA*, *aphA6*, *aadB* e *strB*), genes de resistência a tetraciclina (*tetA*) e a oxacilinase, *bla*_{OXA-229} do subgrupo OXA-228-like, que é intrínseco à espécie (BONNIN *et al.*, 2012; ZANDER *et al.*, 2014).

Relatos de *Acinetobacter* spp., principalmente, *A. baumannii*, resistentes aos carbapenêmicos estão aumentando em todo o mundo e as carbapenemases do tipo OXA compreendem os principais mecanismos associados a esta resistência, principalmente, no Brasil. Nesta perspectiva das infecções relacionadas à assistência à saúde e da resistência aos antimicrobianos, *Acinetobacter* spp. estabelece um grande desafio à terapia antimicrobiana e a disseminação das mesmas e seus genes de resistência parecem adquirir novas dinâmicas. Em resumo, os resultados revelaram a disseminação de dois grandes complexos de *A. baumannii* produtores de OXA-23 em diferentes estados desde 2008. Além disso, foi relatada uma associação entre um gene de carbapenemase e *A. bereziniae*, uma espécie que, raramente, é encontrado em amostras clínicas humanas. A emergência de espécies de *Acinetobacter* não-*baumannii* multirresistentes sugere que estas espécies podem servir como reservatórios para a transferência de determinantes genéticos de resistência para as outras espécies bacterianas tais como *Enterobacteriaceae*.

4 CONCLUSÕES

- Entre os 155 isolados de *A. baumannii*, foram observadas taxas relevantes de resistência superiores a 90% para sete dos 9 antimicrobianos testados, destacando os carbapenêmicos, cuja resistência está associada a produção de OXA-23 para a maioria dos isolados (94.2%, n=146).
- O gene que codifica para a sequência de inserção do tipo *ISAbal* foi detectado na maioria das amostras e sua associação com os genes das oxacilinases (*bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-23-like}) foi evidenciada.
- Entre os isolados bacterianos negativos para *bla*_{OXA-23-like}, mas resistentes a pelo menos um dos carbapenêmicos testados, a presença do elemento *ISAbal* a montante do gene *bla*_{OXA-51-like} pode ser um dos mecanismos que explique o fenótipo de resistência observado.
- A análise molecular através de duas técnicas complementares (PFGE e MLST) permitiu identificar seis grandes complexos clonais circulando no país, sendo CC15 e CC79, os mais prevalentes.
- Esses resultados ilustram o sucesso que estes microrganismos produtores de OXA-23 têm em adquirir resistência aos carbapenêmicos e a sua capacidade de disseminação; e enfatizam a importância da adoção de medidas de controle eficazes.
- Estudos complementares são necessários para ajudar a explicar o sucesso da disseminação dos complexos clonais CC15 e CC79. Fatores de virulência, tais como aderência e formação de biofilmes, merecem ser investigados.
- Ainda, neste trabalho, foi descrito o primeiro caso de *A. bereziniae* produtor de NDM-1 na América do Sul. A caracterização deste isolado de *A. bereziniae* alerta para a emergência de outras espécies do gênero *Acinetobacter* na dinâmica da resistência aos antimicrobianos no país e em outras regiões do

mundo e também reforça o poder de disseminação da metalo-beta-lactamase NDM.

- O sequenciamento de alta vazão dos isolados forneceu informações importantes quanto aos determinantes de resistência. Porém, os dados gerados não foram analisados em sua totalidade, sendo necessárias futuras análises complementares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS S, AHMED I, KUDO T, IIDA T, ALI GM, FUJIWARA T, OHKUMA M. Heavy metal-tolerant and psychrotolerant bacterium *Acinetobacter pakistanensis* sp. nov. isolated from a textile dyeing wastewater treatment pond. *Pak J Agric Sci* 2014; 51(3): 595-608.

ABRAMCZYK ML, CARVALHO WB, CARVALHO ES, MEDEIROS EA. Nosocomial infection in a pediatric intensive care unit in a developing country. *Braz J Infect Dis* 2003; 7(6): 375–380.

ADAMS MD, GOGLIN K, MOLYNEAUX N, HUJER KM, LAVENDER H, JAMISON JJ, MACDONALD IJ, MARTIN KM, RUSSO T, CAMPAGNARI AA, HUJER AM, BONOMO RA, GILL SR. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 2008; 190(24): 8053-8064.

AFZAL-SHAH M, WOODFORD N, LIVERMORE DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001; 45(2): 583–588.

ÁLVAREZ-PÉREZ S, LIEVENS B, JACQUEMYN H, HERRERA CM. *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; 63(Pt4): 1532-1539.

AMBLER RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289(1036): 321-331.

ANANDHAM R, WEON HY, KIM SJ, KIM YS, KIM BY, KWON SW. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. *J Microbiol* 2010; 48(1): 36-39.

BAE IK, JEONG SH, LEE K. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Korean J Clin Microbiol 2012; 15(1): 1-8.

BARAN G, ERBAY A, BODUR H, ONGÜRÜ P, AKINCI E, BALABAN N, CEVIK MA. Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. Int J Infect Dis 2008; 12(1):16-21.

BARBOSA MEM, SIQUEIRA DC, MANTOVANI MF. Controle de infecção hospitalar no Paraná: Facilidades e dificuldades do enfermeiro. Rev Sobecc 2012; 17(3): 50-59.

BARGUIGUA A, EL OTMANI F, LAKBAKBI EL YAAGOUBI F, TALMI M, ZEROUALI K, TIMINOUNI M. First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco. APMIS 2013; 121(7): 675–677.

BARNAUD G, ZIHOUNE N, RICARD JD, HIPPEAUX MC, EVEILLARD M, DREYFUSS D, BRANGER C. Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France. J Hosp Infect 2010; 76(4): 358–60.

BARTUAL SG, SEIFERT H, HIPPLER C, LUZON MA, WISPLINGHOFF H, RODRÍGUEZ-VALERA F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2005; 43(9): 4382-4390.

BAUMANN P, DOUDOROFF M, STANIER RY. A study of the *Moraxella* Group II oxidative-negative species (Genus *Acinetobacter*). J Bacteriol 1968; 95(5): 1520-1541.

BEENKEN SW, KARSENTY G, RAYCROFT L, LOZANO G. An intron binding protein is required for transformation ability of p53. Nucleic Acids Res. 1991; 19(17): 4747–4752.

BERGOGNE-BÉRÉZIN E, TOWNER KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9(2): 148-165.

BERNARDS AT, HARINCK HI, DIJKSHOORN L, VAN DER REIJDEN TJ, VAN DEN BROEK PJ. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25(11): 1002-1004.

BERTINI A, POIREL L, MUGNIER PD, VILLA L, NORDMANN P, CARATTOLI A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(10): 4168–4177.

BOGAERTS P, NAAS T, EL GARCH F, CUZON G, DEPLANO A, DELAIRE T, HUANG TD, LISSOIR B, NORDMANN P, GLUPCZYNSKI Y. GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(11): 4872-4878.

BOGAERTS P, REZENDE DE CASTRO R, ROISIN S, DEPLANO A, HUANG TD, HALLIN M, DENIS O, GLUPCZYNSKI Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium. J Antimicrob Chemother 2012; 67(6):1552–1553.

BONNIN RA, POTRON A, POIREL L, LECUYER H, NERI R, NORDMANN P. PER-7, an extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward broad-spectrum cephalosporins in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2011a; 55(5): 2424-2427.

BONNIN RA, NORDMANN P, POTRON A, LECUYER H, ZAHAR JR, POIREL L. Carbapenem hydrolyzing GES type extended spectrum beta lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2011b; 55(1): 349-354.

BONNIN RA, POIREL L, LICKER M, NORDMANN P. Genetic diversity of carbapenem-hydrolysing β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Romanian hospitals. Clin Microbiol Infect 2011c; 17(10): 1524–1528.

BONNIN RA, OCAMPO-SOSA AA, POIREL L, GUET-REVILLET H, NORDMANN P. Biochemical and genetic characterization of carbapenem-hydrolyzing β -lactamase OXA-229 from *Acinetobacter bereziniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(7): 3923-7.

BOŠNJAK Z, PLECKO V, BUDIMIR A, MAREKOVIĆ I, BEDENIĆ B. First Report of NDM-1-Producing *Acinetobacter guillouiae*. *Chemotherapy* 2014; 60(4): 250-252.

BOU G, MARTÍNEZ-BELTRÁN J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(2): 428-432.

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*. *Int J Syst Bacteriol* 1986; 36(2): 228-240.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Clínica (Manual-Módulo V). 2005. [Acesso em 03 fev. 2009] Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e03a7c0043390bc6aa1aaeff30613c2e/mod_5_2004.pdf?MOD=AJPERES.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Corrente sanguínea - Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde. Brasília, 2009. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/corrente_sanguinea.pdf.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (2013 – 2015). Brasília, 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/814e7d80423556f89181b96d490f120b/PNCIRAS+12122013.pdf?MOD=AJPERES>.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde/

Rede RM. Ano IV Edição nº 8 de Dezembro de 2014a. Disponível em: <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim>.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde/ Rede RM. Ano V Edição nº 9 de Dezembro de 2014b. Disponível em: <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/09-rede-nacional-de-monitoramento-da-resistencia-microbiana-em-servicos-de-saude-rede-rm>.

BRISOU J, PRÉVOT AR. Études de systématique bactérienne. X. Révision des espèces réunies dans le genre *Achromobacter*. Ann Inst Pasteur 1954; 86: 722-728.

BROVEDAN M, MARCHIARO PM, MORÁN-BARRIO J, CAMERANESI M, CERA G, RINAUDO M, VIALE AM, LIMANSKY AS. Complete sequence of a *bla*NDM-1-harboring plasmid in an *Acinetobacter bereziniae* clinical strain isolated in Argentina. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(10): 6667-6669.

BUSH K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. Antimicrob Agents Chemother 1989a; 33(3): 264-270.

BUSH K. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. Antimicrob Agents Chemother 1989b; 33(3): 271-276.

BUSH K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact in the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001; 32(7): 1085-1089.

BUSH K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. J Infect Chemother 2013; 19(4): 549-559.

BUSH K, JACOBY GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(3): 969-976.

BUSH K, JACOBY GA, MEDEIROS AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(6): 1211-1233.

CAI Y, CHAI D, WANG R, LIANG B, BAI N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. J Antimicrob Chemother 2012; 67(7): 1607-15.

CANDEL FJ, CALVO N, HEAD J SÁNCHEZ A, MATESANZ M, CULEBRAS E, BARRIENTOS A, PICAZO J. A combination of tigecycline, colistin, and meropenem against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in a renal transplant recipient: pharmacodynamic and microbiological aspects. Rev Esp Quimioter 2010; 23(2): 103–108.

CARNEIRO M, GONÇALVES RA, DE SOUZA JG, TEIXEIRA CB, KRUMMENAUER EC, MACHADO JAA, WAIB LF, PINA TRENCH FJ. New carbapenases in Brazil. Expert Rev Anti Infect Ther 2014; 12(2): 155–156.

CARR EL, KÄMPFER P, PATEL BK, GÜRTLER V, SEVIOUR RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53(Pt4): 953-963.

CARVALHO-ASSEF APD, PEREIRA PS, ALBANO RM, BERIÃO GC, CHAGAS TPG, TIMM LN, DA SILVA RC, FALCI DR, ASENSI MD. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. J Antimicrob Chemother 2013; 68(12): 2956–2957.

CARVALHO-ASSEF APD, PEREIRA PS, ALBANO RM, BERIÃO GC, TAVARES CP, CHAGAS TPG, MARQUES EA, TIMM LN, DA SILVA RC, FALCI DR, ASENSI MD. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(4): 2475–2476.

CARVALHO KR, CARVALHO-ASSEF APD, PEIRANO G, SANTOS LCG, PEREIRA MJF, ASENSI MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*OXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Int J Antimicrob Agents 2009; 34(1): 25-28.

CASTANHEIRA M, DESHPANDE LM, MATHAI D, BELL JM, JONES RN, MENDES RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in

Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(3): 1274–1278.

CHAGAS TP, SEKI LM, CURY JC, OLIVEIRA JA, DÁVILA AM, SILVA DM, ASENSI MD. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol* 2011; 111(3): 572-581.

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. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 1632-1639.

CHEN CH, YOUNG TG, HUANG CC. Predictive biomarkers for drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates with *bla*(TEM-1), AmpC-type *bla* and integrase 1 genotypes. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39(5): 372-379.

CHOI CH, LEE JS, LEE YC, PARK TI, LEE JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol* 2008; 8: 216.

CHOI JY, KO G, JHEONG W, HUYS G, SEIFERT H, DIJKSHOORN L, KO KS. *Acinetobacter kookii* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; 63(Pt12): 4402-4406.

CHU YW, AFZAL-SHAH M, HOUANG ET, PALEPOU MI, LYON DJ, WOODFORD N, LIVERMORE DM. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(3): 710-714.

CIESLINSKI JM, AREND L, TUON FF, SILVA EP, EKERMANN RG, DALLA-COSTA LM, HIGGINS PG, SEIFERT H, PILONETTO M. Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence-based PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77(4): 337-340.

CLÍMACO EC, OLIVEIRA ML, PITONDO-SILVA A, OLIVEIRA MG, MEDEIROS M, LINCOPAN N, DARINI ALC. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. *Infect Genet Evol* 2013; 19: 127-133.

COELHO J, WOODFORD N, TURTON J, LIVERMORE DM. Multiresistant *Acinetobacter* in the UK: how big a threat? *J Hosp Infect* 2004; 58(3): 167-169.

COELHO J, WOODFORD N, AFZAL-SHAH M, LIVERMORE D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(2): 756–758.

COELHO-SOUZA T, REIS JN, MARTINS N, MARTINS IS, MENEZES AO, REIS MG, SILVA NO, DIAS RCS, RILEY LW, MOREIRA BM. Longitudinal surveillance for meningitis by *Acinetobacter* in a large urban setting in Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(5): E241–244.

CORVEC S, CAROFF N, ESPAZE E, GIRAUDEAU C, DRUGEON H, REYNAUD A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(4): 629–635.

COUTO RC, PEDROSA TMG, NOGUEIRA JM. Infecção hospitalar e outras complicações não infecciosas da doença: epidemiologia, controle e tratamento. 3 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2003.

DA SILVA GJ, CORREIA M, VITAL C, RIBEIRO G, SOUSA JC, LEITÃO R, PEIXE L, DUARTE A. Molecular characterization of *bla*(IMP-5), a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 215(1): 33-39.

DALLA-COSTA LM, COELHO JM, SOUZA HA, CASTRO ME, STIER CJ, BRAGAGNOLO KL, REA-NETO A, PENTEADO-FILHO SR, LIVERMORE DM, WOODFORD N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7): 3403-3406.

DANES C, NAVIA MM, RUIZ J, MARCO F, JURADO A, JIMENEZ DE ANTA MT, VILA J. Distribution of beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (AmpC inhibitor) on the MICs of different betalactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 2002; 50(2): 261-264.

DIANCOURT L, PASSET V, NEMEC A, DIJKSHOORN L, BRISSE S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS ONE 2010; 5(4): e10034.

DIJKSHOORN L, VAN HARSSELAAR B, TJERNBERG I, BOUVET PJ, VANEECHOUTTE M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. Syst Appl Microbiol 1998; 21(1): 33-39.

DIJKSHOORN L, NEMEC A, SEIFERT H. An increasing threat in hospitals multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 2007; 5(12): 939-951.

DI POPOLO A, GIANNOULI M, TRIASSI M, BRISSE S, ZARRILLI R. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries using a multilocus sequencing typing scheme. Clin Microbiol Infect 2011; 17(2): 197-201.

DOLEJSKA M, VILLA L, POIREL L, NORDMANN P, CARATTOLI A. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. J Antimicrob Chemother 2013; 68(1): 34–39.

DORTET L, POIREL L, NORDMANN P. Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. BioMed Res Int 2014; 2014(2014): 1–12.

DRAWZ SM, BONOMO R. Three decades of beta-lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev 2010; 23(1): 160-201.

DZIC S, BEDEKOVIC V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24(6): 519-526.

ECDPC. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. HAI-Net PPS interactive database: Healthcare-associated infections and antimicrobial use in acute care hospitals. [Acesso em 10 abril 2015] Disponível em: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Healthcare-associated_infections

ENDIMIANI A, LUZZARO F, MIGLIAVACCA R, MANTENGOLI E, HUJER AM, HUJER KM, PAGANI L, BONOMO RA, ROSSOLINI GM, TONIOLO A. Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(6): 2211-2214.

EUZÉBY JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Acinetobacter*. *Société de bactériologie systématique et vétérinaire*. [Acesso em: 30 ago 2015] Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>.

EVANS BA, AMYES SG. OXA β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(2): 241-263.

FARIA S, SODANO L, GJATA A, DAURI M, SABATO AF, BILAJ A, MERTIRAJ O, LLAZO E, KODRA Y, SCHINAIA N; PREVALENCE STUDY GROUP. The first prevalence survey of nosocomial infections in the University Hospital Centre “Mother Teresa” of Tirana, Albania. *J Hosp Infect* 2007; 65(3): 244–250.

FENG GD, YANG SZ, WANG YH, DENG MR, ZHU HH. *Acinetobacter guangdongensis* sp. nov., isolated from abandoned lead-zinc ore. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64(Pt10): 3417-3421.

FIGUEIREDO S, POIREL L, PAPA A, KOULOURIDA V, NORDMANN P. Overexpression of the naturally occurring *bla*OXA-51 gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence IS*Aba*9. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(9): 4045-7.

FIGUEIREDO DQ, SANTOS KR, PEREIRA EM, SCHUENCK RP, MENDONÇA-SOUZA CR, TEIXEIRA LM, MONDINO SS. First report of the bla(OXA-58) gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106(3): 368-370.

FIORILLI G, FACCONI D, LOPARDO H, CALLEJO R, RAPOPORT M, PRIETO M, GALAS M, PASTERAN F. Emergence of metallo-beta-lactamases in *Acinetobacter* spp clinical isolates from Argentina. Rev Esp Quimioter 2010; 23(2): 100-102.

FONSECA EL, SCHEIDEGGER E, FREITAS FS, CIPRIANO R, VICENTE AC. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of carO alleles expression and blaOXA-23 gene. BMC Microbiol 2013; 13:245.

FONTANA C, FAVARO M, MINELLI S, BOSSA MC, TESTORE GP, LEONARDIS F, NATOLI S, FAVALLI C. *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates. BMC Infect Dis 2008; 8:79.

FORBES BA, SAHM DF, WEISSFELD AS. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10 ed. St. Louis: Mosby; 1998.

FU Y, DU X, JI J, CHEN Y, JIANG Y, YU Y. Epidemiological characteristics and genetic structure of blaNDM-1 in non-baumannii *Acinetobacter* spp. in China. J Antimicrob Chemother 2012; 67(9): 2114-2122.

FU Y, LIU L, LI X, CHEN Y, JIANG Y, WANG Y, YU Y, XIE X. Spread of a common blaNDM-1-carrying plasmid among diverse *Acinetobacter* species. Infect Genet Evol 2015; 32: 30–3.

FURTADO GH, CAVALCANTE AC, MEDEIROS EA, GALES AC, OLIVEIRA VG, GIRARDELO R. Bloodstream infections with OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in a university-affiliated hospital in Brazil: epidemiology and clinical outcomes. Am J Infect Control 2011; 39(8): 706-708.

GALES AC, JONES RN, FORWARD KR, LIÑARES J, SADER HS, VERHOEF J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin Infect Dis* 2001; 32 Suppl 2: S104-113.

GALES AC, TOGNIM MC, REIS AO, JONES RN, SADER HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45:77-79.

GALES AC, JONES RN, SADER HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(4): 315-321.

GALES AC, JONES RN, SADER HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(9): 2070-2074.

GALES AC, CASTANHEIRA M, JONES RN, SADER HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73(4): 354-360.

GARCÍA-ARATA MI, GERNER-SMIDT P, BAQUERO F, IBRAHIM A. PCR-amplified 16S and 23S rDNA restriction analysis for the identification of *Acinetobacter* strains at the DNA group level. *Res Microbiol* 1997; 148(9): 777-784.

GERNER-SMIDT P, TJERNBERG I, URSING J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 1991; 29(2): 277-282.

GIAMARELLOU H, ANTONIADOU A, KANELLAKOPOULOU K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(2): 106-119.

GKRANIA-KLOTSAS E, HERSHOW RC. Colonization or infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* may be an independent risk factor for increased mortality. *Clin Infect Dis* 2006; 43(9): 1224-1225.

GOGOU V, POURNARAS S, GIANNOULI M, VOULGARI E, PIPERAKI ET, ZARRILLI R, TSAKRIS A. Evolution Of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-2009). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(12): 2767-2772.

GORDON NC, WAREHAM DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35(3): 219-226.

GROSSO F, CARVALHO KR, QUINTEIRA S, RAMOS A, CARVALHO-ASSEF AP, ASENSI MD, PEIXE L. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(1): 62-65.

GUARDABASSI L, PETERSEN A, OLSEN JE, DALSGAARD A. Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. Isolated from Sewers Receiving Waste Effluent from a Hospital and a Pharmaceutical Plant. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(9): 3499-3502.

GUIMARÃES DO, MOMESSO LS, PUPO MT. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim Nova* 2010; 33(3): 667-679.

HÉRITIER C, POIREL L, AUBERT D, NORDMANN P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(1): 268-273.

HÉRITIER C, POIREL L, LAMBERT T, NORDMANN P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8): 3198–3202.

HÉRITIER, C. POIREL, L. NORDMANN, P. Cephalosporinase overexpression resulting from insertion of IS*Aba1* in *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2006; 12(2):123–130.

HIGGINS PG, POIREL L, LEHMANN M, NORDMANN P, SEIFERT H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(12): 5035–5038.

HIGGINS PG, DAMMHAYN C, HACKEL M, SEIFERT H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2010; 65(2): 233-238.

HIGGINS PG, PÉREZ-LLARENA FJ, ZANDER E, FERNÁNDEZ A, BOU G, SEIFERT H. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(5): 2121-2126.

HORAN TC, ANDRUS M, DUDECK MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control 2008; 36(5): 309-332.

HUANG ZM, MAO PH, CHEN Y, WU L, WU J. Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant acinetobacter baumannii. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 2004; 25(5): 425-427.

HUANG LY, CHEN TL, LU PL, TSAI CA, CHO WL, CHANG FY, FUNG CP, SIU LK. Dissemination of multidrug-resistant, class 1 integron-carrying *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. Clin Microbiol Infect 2008; 14(11): 1010-1019.

HUANG LY, LU PL, CHEN TL, CHANG FY, FUNG CP, SIU LK. Molecular characterization of beta-lactamase genes and their genetic structures in *Acinetobacter* genospecies 3 isolates in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(6): 2699-2703.

HUYS G, BARTIE K, CNOCKAERT M, HOANG OANH DT, PHUONG NT, SOMSIRI T, CHINABUT S, YUSOFF FM, SHARIFF M, GIACOMINI M, TEALE A, SWINGS J. Biodiversity of chloramphenicol resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. *Res Microbiol* 2007; 158(3): 228–235.

IBRAHIM A, GERNER-SMIDT P, LIESACK W. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47(3): 837-841.

JACOBY GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(1): 161-82.

JANSSEN P, MAQUELIN K, COOPMAN R, TJERNBERG I, BOUVET P, KERSTERS K, DIJKSHOORN L. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47(4): 1179-1187.

JARDIM JM. Avaliação das práticas de prevenção e controle da infecção da corrente sanguínea associada ao cateter venoso central de curta permanência por meio de indicadores clínicos. São Paulo Dissertação [Mestrado em Enfermagem] – Escola de Enfermagem da USP; 2011.

JAWAD A, SEIFERT H, SNELLING AM, HERITAGE J, HAWKEY PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates *J Clin Microbiol* 1998; 36(7): 1938-1941.

JEONG SH, BAE IK, KWON SB, LEE K, YONG D, WOO GJ, LEE JH, JUNG HI, JANG SJ, SUNG KH, LEE SH. Investigation of a nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 2005; 59(3): 242-248.

JOHNSON AP, WOODFORD N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol* 2013; 62(Pt 4): 499-513.

JOHNSON JK, ARDUINO SM, STINE OC, JOHNSON JA, HARRIS AD. Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 2007; 45(11): 3707-3712.

JONES LS, CARVALHO MJ, TOLEMAN MA, WHITE PL, CONNOR TR, MUSHTAQ A, WEEKS JL, KUMARASAMY KK, RAVEN KE, TÖRÖK ME, PEACOCK SJ, HOWE RA, WALSH TR. Characterization of plasmids in extensively drug-resistant *Acinetobacter* strains isolated in India and Pakistan. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(2): 923–929.

JOVCIC B, LEPSANOVIC Z, SULJAGIC V, RACKOV G, BEGOVIC J, TOPISIROVIC L, KOJIC M. Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. Antimicrobial Agents Chemother 2011; 55(8): 3929–3931.

JUNI E. Genetics and physiology of *Acinetobacter*. Ann Rev Microbiol 1978; 32: 349-371.

KARAH N, SUNDSFJORD A, TOWNER K, SAMUELSEN Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. Drug Resist Updat 2012; 15(4): 237-247.

KAMOLVIT W, HIGGINS PG, PATERSON DL, SEIFERT H. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. J Antimicrob Chemother 2014; 69(4): 959-963.

KIM D, BAIK KS, KIM MS, PARK SC, KIM SS, RHEE MS, KWAK YS, SEONG CN. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. J Microbiol 2008; 46(4): 396-401.

KIM PS, SHIN NR, KIM JY, YUN JH, HYUN DW, BAE JW. *Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, *Apis mellifera*. J Microbiol 2014a; 52(8): 639-645.

KIM UJ, KIM HK, AN JH, CHO SK, PARK KH, JANG HC. Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. *Chonnam Med J* 2014b; 50(2): 37-44.

KOH TH, SNG LH, WANG GC, HSU LY, ZHAO Y. IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(4): 627-632.

KOH TH, TAN TT, KHOO CT, NG SY, TAN TY, HSU LY, OOI EE, VAN DER REIJDEN TJ, DIJKSHOORN L. *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex species in clinical specimens in Singapore. *Epidemiol Infect* 2012; 140(3): 535–538.

KOHLBERG A, BRÜMMER S, HIGGINS PG, SOHR D, PIENING BC, DE GRAHL C, HALLE E, RÜDEN H, SEIFERT H. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. *J Med Microbiol* 2009; 58(Pt11): 1499–1507.

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC, WINN JR WC. *Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido*. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.

KRAWCZYK B, LEWANDOWSKI K, KUR J. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. *Mol Cell Probes* 2002; 16(1): 1-11.

KRIZOVA L, MAIXNEROVA M, SEDO O, NEMEC A. *Acinetobacter bohemicus* sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic. *Syst Appl Microbiol* 2014; 37(7): 467-473.

LA SCOLA B, RAOULT D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(9): 1671–1673.

LA SCOLA B, GUNDI VA, KHAMIS A, RAOULT D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3): 827-832.

LARAKI N, GALLEN M, THAMM I, RICCIO ML, AMICOSANTE G, FRERE JM, ROSSOLINI GM. Structure of In31, a *bla*IMP-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phyletically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(4): 890–901.

LAURETTI L, RICCIO ML, MAZZARIOL A, CORNAGLIA G, AMICOSANTE G, FONTANA R, ROSSOLINI GM. Cloning and characterization of *bla* VIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7): 1584–1590.

LEE K, YUM JH, YONG D, LEE HM, KIM HD, DOCQUIER JD, ROSSOLINI GM, CHONG Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(11): 4485-4491.

LEE MF, PENG CF, HSU HJ, CHEN YH. Molecular characterisation of the metallo-beta-lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(6): 475-480.

LEE Y, KIM CK, LEE H, JEONG SH, YONG D, LEE K. A novel insertion sequence, ISAb10, inserted into ISAb1 adjacent to the *bla*(OXA-23) gene and disrupting the outer membrane protein gene *carO* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(1): 361–363.

LEVIN AS, MENDES CM, SINTO SI, SADER HS, SCARPITTA CR, RODRIGUES E, SAUAIA N, BOULOS M. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in São Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17(6): 366-368.

LI Y, PIAO CG, MA YC, HE W, WANG HM, CHANG JP, GUO LM, WANG XZ, XIE S J, GUO MW. *Acinetobacter puyangensis* sp. nov., isolated from the healthy and

diseased part of *Populus x euramericana* canker bark. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; 63(Pt8): 2963-2969.

LI W, ZHANG D, HUANG X, QIN W. *Acinetobacter harbinensis* sp. nov., isolated from river water. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014a; 64(Pt5): 1507-1513.

LI Y, HE W, WANG T, PIAO CG, GUO LM, CHANG JP, GUO MW, XI SJ. *Acinetobacter qingfengensis* sp. nov., isolated from canker bark of *Populus x euramericana*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014b; 64(pt3): 1043-1050.

LI Y, GUO Q, WANG P, ZHU D, YE X, WU S, WANG M. Clonal dissemination of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing an OXA-23 beta-lactamase at a teaching hospital in Shanghai, China. *J Microbiol Immunol Infect* 2014c; 48(1): 101-108.

LIMA AL, OLIVEIRA PR, PAULA AP. *Acinetobacter* infection *N Engl J Med* 2008; 358(26): 2846-2847.

LIN MF, KUO HY, YEH HW, YANG CM, SUNG CH, TU CC, HUANG ML, LIOU ML. Emergence and dissemination of blaOXA-23-carrying imipenem-resistant *Acinetobacter* sp in a regional hospital in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2011; 44(1): 39-44.

LIN MF, LAN CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World J Clin Cases* 2014; 2(12): 787-814.

LIU L, LI Y, LI S, HU N, HE Y, PONG R, LIN D, LU L, LAW M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 251364.

LOPES BS, GALLEGO L, AMYES SG. Multi-drug resistance profiles and the genetic features of *Acinetobacter baumannii* isolates from Bolivia. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7(4): 323-328.

LUNA EJA. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. *Rev Bras Epidemiol* 2002; 5(3): 229-243.

MAGILL SS, EDWARDS JR, BAMBERG W, BAMBERG W, BELDAVS ZG, DUMYATI G, KAINER MA, LYNFIELD R, MALONEY M, MCALLISTER-HOLLOD L, NADLE J, RAY SM, THOMPSON DL, WILSON LE, FRIDKIN SK; EMERGING INFECTIONS PROGRAM HEALTHCARE-ASSOCIATED INFECTIONS AND ANTIMICROBIAL USE PREVALENCE SURVEY TEAM. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *N Engl J Med* 2014; 370(13):1198-1208.

MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. *Microbiologia de Brock*. 10 ed. São Paulo: Pearson/Prentice Hall; 2004.

MALHOTRA J, ANAND S, JINDAL S, RAJAGOPAL R, LAL R. *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012; 62(Pt12): 2883-2890.

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. *Clin Infect Dis* 2000; 31(1):101-106.

MARAGAKIS LL, PERL TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance and treatment options. *Clin Infect Dis* 2008; 46(8): 1254-1263.

MARRA AR, CAMARGO LF, PIGNATARI AC, SUKIENNIK T, BEHAR PR, MEDEIROS EA, RIBEIRO J, GIRÃO E, CORREA L, GUERRA C, BRITES C, PEREIRA CA, CARNEIRO I, REIS M, DE SOUZA MA, TRANCHESI R, BARATA CU, EDMOND MB; BRAZILIAN SCOPE STUDY GROUP. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* 2011; 49(5): 1866-1871.

MARTINS P. *Epidemiologia das infecções hospitalares em centro de terapia intensiva de adulto*. Belo Horizonte. Dissertação [Mestrado em Medicina Tropical] - Faculdade de Medicina da UFMG; 2006.

MARTINS AF, KUCHENBECKER RS, PILGER KO, PAGANO M, BARTH AL, CMCIES-PMPA/SMS TASK FORCE. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control* 2012; 40(2): 108-112.

MARTINS AF, BARTH AL. *Acinetobacter* multirresistente – um desafio para a saúde pública. *Scientia Medica* 2013; 23(1): 56-62.

MARTINS N, MARTINS IS, DE FREITAS WV, DE MATOS JA, GIRÃO VB, COELHO-SOUZA T, MARALHÃES AC, CACCI LC, DE FIGUEIREDO MP, DIAS RC, COSTA-LOURENÇO AP, FERREIRA AL, DALLA-COSTA L, NOUÉ SA, SANTORO-LOPES G, RILEY LW, MOREIRA BM. Imported and Intensive Care Unit-Born *Acinetobacter baumannii* Clonal Complexes: One-Year Prospective Cohort Study in Intensive Care Patients. *Microb Drug Resist* 2013; 19(3): 216-23.

MISBAH S. HASSAN H, YUSOF MY, HANIFAH YA, ABUBAKAR S. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. *Singapore Med J* 2005; 46(9): 461-464.

MOUBARECK C, BRÉMONT S, CONROY MC, COURVALIN P, LAMBERT T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(8): 3579-3581.

MOSQUEDA N, ESPINAL P, COSGAYA C, VIOTA S, PLASENSIA V, ALVAREZ-LERMA F, MONTERO M, GÓMEZ J, HORCAJADA JP, VILA J, ROCA I. Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: nosocomial outbreak of *acinetobacter baumannii* producing plasmid-encoded OXA-23 in Barcelona, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(10): 5155–5157.

MUGNIER PD, POIREL L, NAAS T, NORDMANN P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(1): 35–40.

MUNOZ-PRICE LS, ROBERT A, WEINSTEIN, MD. *Acinetobacter* infection. *New Engl J Med* 2008; 358(12): 1271-1281.

MURRAY PR, BARON EJ, JORGENSEN JH, PFALLER MA, YOLKEN RH. Manual of Clinical Microbiology. 9 ed. Washington: ASM Press; 2007.

NAAS T, LEVY M, HIRSCHAUER C, MARCHANDIN H, NORDMANN P. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. J Clin Microbiol 2005; 43(9): 4826–4829.

NAAS T, COIGNARD B, CARBONNE A, BLANCKAERT K, BAJOLET O, BERNET C, VERDEIL X, ASTAGNEAU P, DESENCLOS JC, NORDMANN P. VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. Emerg Infect Dis 2006; 12(8): 1214-1222.

NAAS T, NAMDARI F, RÉGLIER-POUPET H, POYART C, NORDMANN P. Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City. J Antimicrob Chemother 2007; 60(5): 1174-1176.

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. J Clin Microbiol 2004; 42(9): 3978-3984.

NEMEC A, DE BAERE T, TJERNBERG I, VANEECHOUTTE M, VAN DER REIJDEN TJ, DIJKSHOORN L. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51(Pt5): 1891-1899.

NEMEC A, DIJKSHOORN L, CLEENWERCK I, DE BAERE T, JANSSENS D, VAN DER REIJDEN TJK, JEŽEK P, VANEECHOUTTE M. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53(Pt5): 1563-1567.

NEMEC A, MUSÍLEK M, MAIXNEROVÁ M, DE BAERE T, VAN DER REIJDEN TJK, VANEECHOUTTE M, DIJKSHOORN L. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. Int J Syst Evol Microbiol 2009; 59(Pt1): 118-124.

NEMEC A, MUSÍLEK M, ŠEDO O, DE BAERE T, MAIXNEROVÁ M, VAN DER REIJDEN TJK, ZDRÁHAL Z, VANEECHOUTTE M, DIJKSHOORN L. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter genomic* species 10 and 11, respectively. Int J Syst Evol Microbiol 2010; 60(Pt4): 896-903.

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). Res Microbiol 2011; 162(4): 393-404.

NEMOY LL, KOTETISHVILI M, TIGNO J, KEEFER-NORRIS A, HARRIS AD, PERENCEVICH EN, JOHNSON JA, TORPEY D, SULAKVELIDZE A, MORRIS JG JR, STINE OC. Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. J Clin Microbiol 2005; 43(4):1776-81.

NISHIMURA Y, INO T, IIZUKA H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. Int J Syst Bacteriol 1988; 38: 209-211.

NORDMANN P, CUZON G, NAAS T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis 2009; 9(4): 228-236.

NORDMANN P, POIREL L, WALSH TR, LIVERMORE DM. The emerging NDM carbapenemases. Trends Microbiol 2011; 19(12): 588-95.

OLIVEIRA R, MARUYAMA SAT. Controle de infecção hospitalar: histórico e papel do estado. Rev Eletr Enf 2008; 10(3): 775-783.

OLIVEIRA AC, DAMASCENO QS, RIBEIRO SMCP. Infecções relacionadas à assistência em saúde: Desafios para a prevenção e controle. Rev Min Enferm 2009; 13(3): 445-450.

OLIVEIRA VDC, RUBIO FG, ALMEIDA MT, NOGUEIRA MC, PIGNATARI AC. Trends of 9,416 multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Rev Assoc Med Bras 2015; 61(3): 244-249.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. La contención de la resistencia a los antimicrobianos. 2005. [Acesso em 19 out. 2010] Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_PSM_2005.1_spa.pdf.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Contengamos la resistencia microbiana. [Acesso em 20 out. 2010] Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_CDS_2000.2_spa.pdf.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Epidemiological Alert: Nosocomial Transmission of NDM-Type Multiresistant Bacteria, 19 December 2012. [Acesso em 16 set. 2010] Disponível em: [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19623&Itemid=\(11](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19623&Itemid=(11) June 2013, date last accessed).

OPAZO A, SONNEVEND A, LOPES B, HAMOUDA A, GHAZAWI A, PAL T, AMYES SG. Plasmid-encoded PER-7 β -lactamase responsible for ceftazidime resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated in the United Arab Emirates. J Antimicrob Chemother 2012; 67(7): 1619-1622.

PAGANO M, MARTINS AF, MACHADO AB, BARIN J, BARTH AL. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAba1 upstream *bla*OXA-51-like gene in Porto Alegre, Southern Brazil. Epidemiol Infect 2013; 141(2): 330-333.

PAGANO M, POIREL L, MARTINS AF, ROZALES FP, ZAVASCKI AP, BARTH AL, NORDMANN P. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. Int J Antimicrob Agents 2015; 45(4): 444-445.

PAGEL JE, SEYFRIED PL. Numerical taxonomy of aquatic *Acinetobacter* isolates. J Gen Microbiol 1976; 95(2): 220-232.

PALZKILL T. Metallo-beta-lactamase structure and function. Ann N Y Acad Sci 2013; 1277: 91-104.

PAPA A, KOULOURIDA V, SOULIOU E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a newly established Greek hospital. *Microb Drug Resist* 2009; 15(4): 257-260.

PARK YK, JUNG SI, PARK KH, KIM SH, KO KS. Characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii* in South Korea. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39(1): 81-85.

PASTERÁN F, RAPOPORT M, PETRONI A, FACCONI D, CORSO A, GALAS M, VÁZQUEZ M, PROCOPIO A, TOKUMOTO M, CAGNONI V. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(9): 3222-3224.

PATON R, MILES RS, HOOD J, AMYES SG, MILES RS, AMYES SG. ARI-1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993; 2(2):81-87.

PELEG AY, SEIFERT H, PATERSON DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(3): 538-582.

PEREZ F, HUJER AM, HUJER KM, DECKER BK, RATHER PN, BONOMO RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(10): 3471-3484.

PILLONETTO M, AREND L, VESPERO EC, PELISSON M, CHAGAS TPG, CARVALHO-ASSEF APD, ASENSI MD. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(12): 7592–7594.

POIREL L, CABANNE L, VAHABOGLU H, NORDMANN P. Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase blaPER-1 gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(5): 1708-1713.

POIREL L, NORDMANN P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(9): 826–36.

POIREL L, CORVEC S, RAPOPORT M, MUGNIER P, PETRONI A, PASTERAN F, FACCONI D, GALAS M, DRUGEON H, CATTOIR V. Identification of the novel narrow-spectrum beta-lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(6): 2179-2184.

POIREL L, NAAS T, NORDMANN P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1): 24-38.

POIREL L, DORTET L, BERNABEU S, NORDMANN P. Genetic features of *bla*NDM-1-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2011a; 55(11): 5403–5407.

POIREL L, ROS A, CARRICAJA A, BERTHELOT P, POZZETTO B, BERNABEU S, NORDMANN P. Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2011b; 55(1): 447–448.

POIREL L, BONNIN RA, BOULANGER A, SCHRENZEL J, KAASE M, NORDMANN P. Tn125-related acquisition of *bla*NDM-like genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(2): 1087-1089.

POTRON A, POIREL L, CROIZÉ J, CHANTEPERDRIX V, NORDMANN PP. Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type beta-lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(7): 3010-3016.

POTRON A, MUNOZ-PRICE LS, NORDMANN P, CLEARY T, POIREL L. Genetic features of CTX-M-15-producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(12): 5946-5948.

PRADE SS, FELIX J, MENDES A, GADELHA MZ, PEREIRA M. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospital terciário. *Rev Cont Inf Hosp* 1995; 2(2): 11-24.

PRINCIPE L, PIAZZA A, GIANI T, BRACCO S, CALTAGIRONE MS, ARENA F, NUCLEO E, TAMMARO F, ROSSOLINI GM, PAGANI L, LUZZARO F, AMCLI-CRAB SURVEY PARTICIPANTS. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. J Clin Microbiol 2014; 52(8): 3004–3010.

QUEENAN AM, BUSH K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2007; 20(3): 440-458.

QUINTEIRA S, GROSSO F, RAMOS H, PEIXE L. Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(9): 3465–3466.

QUIÑONES D, CARVAJAL I, PEREZ Y, HART M, PEREZ J, GARCIA S, SALAZAR D, GHOSH S, KAWAGUCHIYA M, AUNG MS, KOBAYASHI N. High prevalence of blaOXA-23 in *Acinetobacter* spp. and detection of bla NDM-1 in *A. soli* in Cuba: report from National Surveillance Program (2010-2012). New Microbes New Infect 2015; 7: 52-56.

RAMÍREZ MS, PIÑEIRO S, ARGENTINIAN INTEGRON STUDY GROUP, CENTRÓN D. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(2): 699-706.

RICCIO ML, FRANCESCHINI N, BOSCHI L, CARAVELLI B, CORNAGLIA G, FONTANA R, AMICOSANTE G, ROSSOLINI GM. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(5): 1229-1235.

RICE LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis 2008; 197(8): 1079-1081.

ROBENSHTOK E, PAUL M, LEBOVICI L, FRASER A, PITLIK S, OSTFELD I, SAMRA Z, PEREZ S, LEV B, WEINBERGER M. The significance of *Acinetobacter*

baumannii bacteraemia compared with Klebsiella pneumoniae bacteraemia: risk factors and outcomes. J Hosp Infect. 2006; 64(3): 282-7

ROBLEDO IE, AQUINO EE, SANTÉ MI, SANTANA JL, OTERO DM, LEÓN CF, VÁZQUEZ GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(3): 1354-1357.

ROCA I, ESPINAL P, VILA-FARRÉS X, VILA J. The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. Front Microbiol 2012; 3:148.

ROCHA LF, LEMES NA, BRASILEIRO ME. A Atuação da Comissão de Controle de Infecção em Serviços de Saúde na Unidade de Terapia Intensiva: O que fazer? Rev Eletr de Enf Cent de Est de Enf Nut 2010; 1(1): 1-16.

ROSENTHAL VD, MAKI DG, SALOMAO R, MORENO CA, MEHTA Y, HIGUERA F, CUELLAR LE, ARIKAN OA, ABOUQAL R, LEBLEBICIOGLU H; INTERNATIONAL NOSOCOMIAL INFECTION CONTROL CONSORTIUM. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. Ann Intern Med 2006; 145(8):582–591

ROSSI F, ANDREAZZI DB. Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma. São Paulo: Atheneu; 2005.

ROZALES FP, RIBEIRO VB, MAGAGNIN CM, PAGANO M, LUTZ L, FALCI DR, MACHADO A, BARTH AL, ZAVASCKI AP. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. Int J Infect Dis 2014; 25: 79–81.

RUIZ M, MARTI S, FERNANDEZ-CUENCA F, PASCUAL A, VILA J. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. Clin Microbiol Infect 2007; 13(12):1192–1198.

RUPPÉ É, WOERTHER PL, BARBIER F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. Ann Intensive Care 2015; 5(1): 61.

SAAVEDRA SY, CAYÔ R, GALES AC, LEAL AL, SAAVEDRA CH. Early dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* strain in Colombia: a case report. Braz J Infect Dis 2014; 18(6): 678-80.

SADER HS, CASTANHEIRA M, MENDES RE, TOLEMAN M, WALSH TR, JONES RN. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Int J Antimicrob Agents 2005; 1: 57-61.

SAMUELSEN O, NASEER U, KARAH N, LINDEMANN PC, KANESTRØM A, LEEGAARD TM, SUNDSFJORD A. Identification of *Enterobacteriaceae* isolates with OXA-48 and coproduction of OXA-181 and NDM-1 in Norway. J Antimicrob Chemother 2013; 68(7): 1682–1685.

SANTOS NQ. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. Texto Contexto Enferm 2004; 13: 64-70.

SCHIMITH BIER KE, LUIZ SO, SCHEFFER MC, GALES AC, PAGANINI MC, NASCIMENTO AJ, CARIGNANO E, DALLA COSTA LM. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. Am J Infect Control 2010; 38(4): 308-314

SIEVERT DM, RICKS P, EDWARDS JR, SCHNEIDER A, PATEL J, SRINIVASAN A, KALLEN A, LIMBAGO B, FRIDKIN S, NATIONAL HEALTHCARE SAFETY NETWORK (NHSN) TEAM AND PARTICIPATING NHSN FACILITIES. Antimicrobial-resistant Pathogens Associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers For Disease Control and Prevention, 2009-2010. Infect Control Hosp Epidemiol 2013; 34(1): 1-14.

SINGH A, GOERING RV, SIMJEE S, FOLEY SL, ZERVOS MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 2006; 19(3): 512-530.

SLAMA TG. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. Crit care 2008; 12(Suppl4): S4.

SMET A, COOLS P, KRIZOVA L, MAIXNEROVA M, SEDO O, HAESEBROUCK F, KEMPF M, NEMEC A, VANEECHOUTTE M. *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. Int J Syst Evol Microbiol 2014; 64(Pt12): 4007-4015.

SMITH CA, ANTUNES NT, STEWART NK, TOTH M, KUMARASIRI M, CHANG M, MOBASHERY S, VAKULENKO SB. Structural basis for carbapenemase activity of the OXA-23 beta-lactamase from *Acinetobacter baumannii*. Chem Biol 2013; 20(9): 1107–1115.

STIETZ MS, RAMÍREZ MS, VILACOB A E, MERKIER AK, LIMANSKY AS, CENTRÓN D, CATALANO M. *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I–III. Infect Genet Evol 2013; 14: 294-301.

STOEVA T, HIGGINS PG, BOJKOVA K, SEIFERT H. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital. Clin Microbiol Infect 2008; 14(7): 723–727.

SUAREZ C, GUDIOL F. Antibióticos Betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2009; 27(2): 116-129.

SUNG JY, KOO SH, KIM S, KWON GC. Emergence of *Acinetobacter pittii* Harboring New Delhi Metallo-beta-Lactamase Genes in Daejeon, Korea. Ann Lab Med 2015; 35(5): 531-534.

TIDWELL TT. Hugo (Ugo) Schiff, Schiff Bases, and a Century of b-Lactam Synthesis. Angew Chem Int 2007; 47(6): 1016-1020.

TOGNIM MC, GALES AC, PENTEADO AP, SILBERT S, SADER HS. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27(7): 742-747.

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. Microbiologia. 8 ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.

TRABULSI LR, ALTERTHUM F, GOMPERTZ OF, CANDEIAS JA. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 1999.

TSAKRIS A, IKONOMIDIS A, POURNARAS S, TZOUVELEKIS LS, SOFIANOU D, LEGAKIS NJ, MANIATIS AN. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Emerg Infect Dis 2006; 12(6): 981-983.

TSAKRIS A, IKONOMIDIS A, POULOU A, SPANAKIS N, VRIZAS D, DIOMIDOUS M, POURNARAS S, MARKOU F. Clusters of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones producing different carbapenemases in an intensive care unit. Clin Microbiol Infect 2008; 14(6): 588-594.

VAHABOGLU H, OZTÜRK R, AYGÜN G, COŞKUNKAN F, YAMAN A, KAYGUSUZ A, LEBLEBICIOGLU H, BALIK I, AYDIN K, OTKUN M. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(10): 2265-2269.

VALENTINE SC, CONTRERAS D, TAN S, REAL LJ, CHU S, XU HH. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. J Clin Microbiol 2008; 46(8): 2499-2507.

VALENZUELA JK, THOMAS L, PARTRIDGE SR, VAN DER REIJDEN T, DIJKSHOORN L, IREDELL J. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2007; 45(2): 453-460.

VAN DEN BROEK PJ, ARENDS J, BERNARDS AT, DE BRAUWER E, MASCINI EM, VAN DER REIJDEN TJ, SPANJAARD L, THEWESSEN EA, VAN DER ZEE A, VAN ZEIJL JH, DIJKSHOORN L. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks

in The Netherlands during the period 1999-2001. Clin Microbiol Infect 2006; 12(9): 837-843.

VAN LOOVEREN M, GOOSENS H, ARPAC STEERING GROUP. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10(8): 684–704.

VANEECHOUTTE M, NEMEC A, MUSÍLEK M, VAN DER REIJDEN TJ, VAN DEN BARSELAAR M, TJERNBERG I, CALAME W, FANI R, DE BAERE T, DIJKSHOORN L. Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello et al. 1997 sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2009; 59(Pt 6): 1376-1381.

VASCONCELOS AT, BARTH AL, ZAVASCKI AP, GALES AC, LEVIN AS, LUCAREVSCHI BR, CABRAL BG, BRASILIENSE DM, ROSSI F, FURTADO GH, CARNEIRO IC, DA SILVA JO, RIBEIRO J, LIMA KV, CORREA L, BRITTO MH, SILVA MT, DA CONCEIÇÃO ML, MOREIRA M, MARTINO MD, DE FREITAS MR, OLIVEIRA MS, DALBEN MF, GUZMAN RD, CAYÔ R, MORAIS R, SANTOS SA, MARTINS WM. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. Diagn Microbiol Infect Dis 2015 Cited in Pubmed; PMID: 26364001.

VAZ-MOREIRA I, NOVO A, HANTSIS-ZACHAROV E, LOPES AR, GOMILA M, NUNES OC, MANAIA CM, HALPERN M. *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. Int J Syst Evol Microbiol 2011; 61(Pt2): 2837-2843.

VERONESI R, FOCACCIA R. Tratado de Infectologia. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2004.

VILA J, MARTI S, SANCHEZ-C´ESPEDES J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2007; 59(6): 1210–1215.

VILLALON P, VALDEZATE S, MEDINA-PASCUAL MJ, RUBIO V, VINDEL A, SAEZ-NIETO JA. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. J Clin Microbiol 2011; 49(3): 875–882.

VILLALON P, VALDEZATE S, MEDINA-PASCUAL MJ, CARRASCO G, VINDEL A, SAEZ-NIETO JA. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo-beta-lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. J Antimicrob Chemother 2013; 68(3): 550–553.

VILLEGAS MV, KATTAN JN, CORREA A, LOLANS K, GUZMAN AM, WOODFORD N, LIVERMORE D, QUINN JP. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(6): 2001-2004.

VINCENT JL, RELLO J, MARSHALL J, SILVA E, ANZUETO A, MARTIN CD, MORENO R, LIPMAN J, GOMERSALL C, SAKR Y, REINHART K, EPIC II GROUP OF INVESTIGATORS. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. JAMA 2009; 302(21): 2323-2329.

VISCA P, SEIFERT H, TOWNER KJ. *Acinetobacter* infection-an emerging threat to human health. IUBMB Life 2011; 63(12): 1048-1054.

WANG J, RUAN Z, FENG Y, FU Y, JIANG Y, WANG H, YU Y. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. PLoS One 2014; 9(8): e104882.

WANG SH, SHENG WH, CHANG YY, WANG LH, LIN HC, CHEN ML, PAN HJ, KO WJ, CHANG SC, LIN FY. Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. J Hosp Infect 2003; 53(2): 97-102.

WERNECK JS, PICÃO RC, CARVALHAES CG, CARDOSO JP, GALES AC. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. J Antimicrob Chemother 2011; 66(2): 452-454.

WISPLINGHOFF H, SCMITT R, WOHRMANN A, STEFANIK D, SEIFERT H. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Hosp Infect 2007; 66(2): 174-181.

YAMAMOTO S, HARAYMA S. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequence of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46(2): 506-511.

YAMAMOTO M, NAGAO M, MATSUMURA Y, MATSUSHIMA A, ITO Y, TAKAKURA S, ICHIYAMA S. Interspecies dissemination of a novel class 1 integron carrying *bla*IMP-19 among *Acinetobacter* species in Japan. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(11): 2480-2483.

YAMAMOTO M, NAGAO M, MATSUMURA Y, HOTTA G, MATSUSHIMA A, ITO Y, TAKAKURA S, ICHIYAMA S. Regional dissemination of *Acinetobacter* species harbouring metallo-beta-lactamase genes in Japan. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(8): 729-36.

YANG J, CHEN Y, JIA X, LUO Y, SONG Q, ZHAO W, WANG Y, LIU H, ZHENG D, XIA Y, YU R, HAN X, JIANG G, ZHOU Y, ZHOU W, HU X, LIANG L, HAN L. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(12): E506–513.

YOUNG LS, SABEL AL, PRICE CS. Epidemiologic, clinical, and economic evaluation of an outbreak of clonal multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a surgical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28(11): 1247-1254.

YONG D, TOLEMAN MA, GISKE CG, CHO HS, SUNDMAN K, LEE K, WALSH TR. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(12): 5046–5054.

YUM JH, YI K, LEE H, YONG D, LEE K, KIM JM, ROSSOLINI GM, CHONG Y. Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*(VIM-2) gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(5): 837-840.

ZANDER E, SEIFERT H, HIGGINS PG. Insertion sequence IS18 mediates overexpression of blaOXA-257 in a carbapenem-resistant *Acinetobacter bereziniae* isolate. J Antimicrob Chemother 2014; 69(1): 270-271.

ZARRILLI R, CRISPINO M, BAGATTINI M, BARRETTA E, DI POPOLO A, TRIASSI M, VILLARI P. Molecular Epidemiology of Sequential Outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit Shows the Emergence of Carbapenem Resistance. J Clin Microbiol 2004; 42(3): 946-953.

ZARRILLI R, POURNARAS S, GIANNOULI M, TSAKRIS A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. Int J Antimicrob Agents 2013; 41(1): 11-19.

ZMARLICKA MT, NAILOR MD, NICOLAU DP. Impact of the New Delhi metallo-beta-lactamase on beta-lactam antibiotics. Infect Drug Resist 2015; 8: 297-309.

ANEXO A - PERFIS DE RESISTÊNCIA E DO PFGE DOS 155 ISOLADOS DE *A. baumannii* (2008-2011).

Table A.1: Antimicrobial resistance profiles and PFGE-characterization of 155 multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* collected from eleven states during 2008-2011.

PFGE pulsotypes n(%)	Year	State (n)	Antimicrobial resistance profiles (n)	OXA-23 producers n (%)
Ab1 / 58 (36.3)	2008-11	DF (1); ES (6); GO (25);	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=36)	57(98.2)
		MG (1); RJ(20); RN (1);	SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP,IPM, MEM, SXT (n=9)	
		SC (1); MS (3)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM (n=8)	
			SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP,IPM, MEM (n=4)	
			AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP, CIP (n=1)	
Ab2 / 29 (18.1)	2009-10	GO (28); MS (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=13)	29 (100)
			AK, TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	
			AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM (n=15)	
Ab3/ 15 (9.4)	2010-11	DF (1); ES (4) MG (1); RJ	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM,MEM, SXT (n=13)	14 (93.3)
		(8); RN (1)	SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	
			AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP,SXT(n=1)	
Ab4 / 6 (3.8)	2008-10	AL (1); ES (4); RJ (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=5)	6 (100)
			SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	

AL, Alagoas; AM, Amazonas; BA, Bahia; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; SC, Santa Catarina; AK, amikacin; ATM, aztreonam, CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MEM, meropenem; SAM, ampicillin/sulbactam; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; TZP, piperacillin/tazobactam.

Table A.1: Continuação

PFGE pulsotypes n(%)	Year	State (n)	Antimicrobial resistance profiles (n)	OXA-23 producers n (%)
Ab5 / 4 (2.5)	2009	ES (4)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM (n=4)	4 (100)
Ab6 / 4 (2.5)	2008-09	RJ (4)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1) AK,SAM,TZP,ATM, FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1) SAM,TZP,ATM, FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=2)	4 (100)
Ab7 / 3 (1.9)	2010	MS (3)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=3)	3 (100)
Ab8 / 3 (0.6)	2008-09	RJ (3)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=3)	3 (100)
Ab9 / 3 (1.9)	2008-10	RJ (2); MS (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=2) AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM (n=1)	3 (100)
Ab10 / 2 (1.3)	2010	ES (2)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1) AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM (n=1)	2 (100)
Ab11 / 2 (1.3)	2010-11	MG (1); RN (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1) AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM (n=1)	2 (100)
Ab12 / 2 (1.25)	2009	ES (2)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=2)	2 (100)
Ab13 / 2 (1.25)	2008-09	RJ (2)	AK, TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1) AK, TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP,SXT (n=1)	0 (0)
Ab14 / 1 (0.6)	2009	GO (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ, CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab15 / 1 (0.6)	2009	GO (1)	AK, TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, SXT (n=1)	1 (100)

AL, Alagoas; AM, Amazonas; BA, Bahia; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; SC, Santa Catarina; AK, amikacin; ATM, aztreonam, CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MEM, meropenem; SAM, ampicillin/sulbactam; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; TZP, piperacillin/tazobactam.

Table A.1: Continuação

PFGE pulsotypes n(%)	Year	State (n)	Antimicrobial resistance profiles (n)	OXA-23 producers n (%)
Ab16 / 1 (0.6)	2010	ES (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab17 / 1 (0.6)	2009	ES (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab18 / 1 (0.6)	2010	GO (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM (n=1)	0 (0)
Ab19 / 1 (0.6)	2009	AM (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab20 / 1 (0.6)	2008	RJ (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab21 / 1 (0.6)	2008	RJ (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab22 / 1 (0.6)	2009	ES (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab23 / 1 (0.6)	2010	GO (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, SXT (n=1)	0 (0)
Ab24 / 1 (0.6)	2010	MG (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab25 / 1 (0.6)	2008	RJ (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab26 / 1 (0.6)	2009	MG (1)	SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab27 / 1 (0.6)	2009	MG	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab28 / 1 (0.6)	2008	RJ	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab29/ 1 (0.6)	2010	MS	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab30 / 1 (0.6)	2009	MG	SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, SXT (n=1)	0 (0)
Ab31 / 1 (0.6)	2008	GO	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, SXT (n=1)	0 (0)
Ab32 / 1 (0.6)	2009	MG	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)

AL, Alagoas; AM, Amazonas; BA, Bahia; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; SC, Santa Catarina; AK, amikacin; ATM, aztreonam, CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MEM, meropenem; SAM, ampicillin/sulbactam; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; TZP, piperacillin/tazobactam.

Table A.1: Cont.

PFGE pulsotypes n(%)	Year	State (n)	Antimicrobial resistance profiles (n)	OXA-23 producers n (%)
Ab33 / 1 (0.6)	2010	AL (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	1 (100)
Ab34 / 1 (0.6)	2010	ES (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, MEM (n=1)	0 (0)
Ab35 / 1 (0.6)	2011	BA (1)	AK,SAM,TZP,ATM,CAZ,FEP,CIP, IPM, MEM, SXT (n=1)	0(0)
Total / 155				146 (94.2)

AL, Alagoas; AM, Amazonas; BA, Bahia; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; SC, Santa Catarina; AK, amikacin; ATM, aztreonam, CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MEM, meropenem; SAM, ampicillin/sulbactam; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; TZP, piperacillin/tazobactam.

ANEXO B- ARTIGOS NA FORMATAÇÃO ORIGINAL

A seguir, encontram-se os artigos apresentados, na seção Resultados e Discussão desta tese, na formatação original das revistas onde foram publicados.



Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008–2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79)[☆]

Thiago Pavoni Gomes Chagas¹, Karyne Rangel Carvalho¹, Ivson Cassiano de Oliveira Santos, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef, Marise Dutra Asensi^{*}

Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 October 2013

Received in revised form 1 March 2014

Accepted 9 March 2014

Available online 17 March 2014

Keywords:

Acinetobacter baumannii

Carbapenem resistance

OXA-23

MLST

Brazil

ABSTRACT

The study investigated the genetic relationship of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolated from inpatients during 2008–2011 from 11 Brazilian states. Antimicrobial susceptibility profile was determined by disc diffusion method and Etest. Polymerase chain reaction was applied for carbapenemase genes, and IS*Aba1*. Isolates were subjected to pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) for molecular typing. Most of the isolates showed high resistance rates to antibiotics tested. The *bla*_{OXA-51-like} gene was found in all isolates, and 146 (94.2%) isolates were positive for *bla*_{OXA-23-like}. In the most OXA-23-producing isolates, the *bla*_{OXA-23-like} gene was accompanied by IS*Aba1*. A total of 146 OXA-23-producing isolates were clustered into 28 genotypes by PFGE. Molecular analysis by MLST identified 13 sequence types (STs). The most prevalent PFGE profiles were designated as ST15 (CC15), ST1 (CC1), and ST79 (CC79). This study showed the widespread of clonal complexes of *A. baumannii* harboring the *bla*_{OXA-23-like} gene in different Brazilian states.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen increasingly affecting severely ill patients. This microorganism is highly capable of surviving and spreading in the hospital environment and to develop resistance to antimicrobial agents. In the last years, carbapenem resistance has been reported among *A. baumannii* isolates and is often associated to infections with high morbidity and mortality rates. Carbapenem-hydrolysing class D β-lactamases of the oxacilinases are the most important cause of carbapenem resistance in *A. baumannii* worldwide (Poirel and Nordmann, 2005, Poirel and Nordmann, 2006 and Zarrilli et al., 2013).

In Brazil, *A. baumannii* has become particularly problematic because of its prevalence and the carbapenems resistance, usually related to oxacilinases, mostly involving OXA-23 producers, with reports of local outbreaks since the late 90s (Carvalho et al., 2009; Dalla-Costa et al., 2003). The first report of *A. baumannii* resistant to carbapenems was in 2003 with the description of 8 isolates collected from hospitalized patients hospitalized at 2 hospitals in the Southern

Brazil (Curitiba – Paraná State). These isolates were OXA-23 producers and were part of the same clone, demonstrating the occurrence of inter-hospital spread in that city (Dalla-Costa et al., 2003). In 2009, we described the spread of multidrug resistance (MDR) OXA-23-producing *A. baumannii* clones in the city of Rio de Janeiro: 2 clones were prevalent, one being scattered at 7 hospitals and the second one in other 5 hospitals (Carvalho et al., 2009). In the following years, this microorganism has been identified in other Brazilian states.

Molecular epidemiological studies are important tools to clarify the dissemination of MDR *A. baumannii*, to understand epidemic dynamics and to identify the most efficient control measures. Thus, this study aimed to characterize carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates recovered in 11 Brazilian states over a 3-year period (2008–2011), determining their genetic relationship by multilocus sequence typing (MLST) analysis.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial isolates

A total of 155 *A. baumannii* clinical isolates representing 11 Brazilian states belonging to 5 different geographical regions of this country were included. They were collected at the Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS)/Mato Grosso do Sul (MS) (n = 9) and Central Public Health Laboratories (LACENs) of Alagoas (AL) (n = 2), Amazonas (AM) (n = 1), Bahia (BA) (n = 1), Distrito

[☆] This report were presented in part at the 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, Germany, 2013 [ePoster VI session, eP753].

^{*} Corresponding author. Tel.: +55-2125621636; fax: +55-2125621634.

E-mail address: marise@ioc.fiocruz.br (M.D. Asensi).

¹ Authors contributed equally to this work.

Federal (DF) (n = 2), Espírito Santo (ES) (n = 26), Goiás (GO) (n = 58), Minas Gerais (MG) (n = 8), Rio de Janeiro (RJ) (n = 44), Rio Grande do Norte (RN) (n = 3), and Santa Catarina (SC) (n = 1) from February 2008 to January 2011 (1 per patient). The most frequent sites of isolation for these isolates were blood (18.7%), respiratory tract secretions (18.0%), catheter (13.5%), and urine (3.9%).

2.2. Identification and antimicrobial susceptibility testing

A. baumannii isolates were identified by classical biochemical techniques, amplification of the *rpoB* (Gundi et al., 2009) and *bla*_{OXA-51-like} gene, and by amplified ribosomal DNA restriction analysis (Vanechoutte et al., 1995). The disc diffusion method was used to evaluate susceptibility to the antimicrobial agents according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2012). MIC values for imipenem, meropenem, polymyxin B, and tigecycline were determined by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) (CLSI, 2012).

2.3. Molecular investigations

A multiplex polymerase chain reaction (PCR) was used to detect genes encoding the OXA-like carbapenemases OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, and OXA-143 (Higgins et al., 2010). Additional screening of other carbapenemase encoding genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}) and insertion sequence *ISAbal* was performed by PCR (Naas et al., 2008; Nordmann et al., 2011; Turton et al., 2006). To determine whether *ISAbal* was present upstream of *bla*_{OXA-51-like} and *bla*_{OXA-23-like} gene, PCR mapping experiments using *ISAbal* forward/OXA-51-like reverse or OXA-23-like reverse primers (*ISAbal*F/OXA-51-likeR or OXA-23-likeR PCR) were performed (Pagano et al., 2013; Chaulagain et al., 2012).

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing was performed using *Apal* restriction enzyme (Carvalho et al., 2009). DNA fragments were separated on 1% (w/v) agarose gels in 0.5% Tris-borate-EDTA buffer using a CHEF DRIII apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The patterns obtained were analysed by BioNumerics v.4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) with Dice similarity coefficient analysis. The unweighted-pair group method using average linkages was applied, and the bandwidth tolerance was set at 1.5%. Isolates clustering together with 85% level of similarity were considered to belong to the same genotype.

Isolates representing OXA-23-producing *A. baumannii* PFGE clones were further tested by the MLST scheme developed by the Institute Pasteur (www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html) (Diancourt et al., 2010). DNA sequencing was performed with Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analyzed using an ABI Prism 3100 genetic analyser (Applied Biosystems) at the PDTIS-IOC DNA Sequencing Platform. To determine the CCs (complex clonal), eBURST software (<http://eburst.mlst.net/>) was used.

3. Results

3.1. Resistance patterns and screening of carbapenemase encoding genes and insertion sequence *ISAbal*

According to the results of the antimicrobial susceptibility testing, all antimicrobials tested showed elevated resistance rate, and the most of the isolates were resistant to more than 5 different classes of antibiotics. Ciprofloxacin, cefepime, and piperacillin/tazobactam showed the highest resistance rate (99.4%, n = 154), followed by ceftazidime (97.4%, n = 151), imipenem (95.5%, n = 148), meropenem (94.2%, n = 146), and ampicillin/sulbactam (93.5%, n = 145). Sulfamethoxazole/trimethoprim showed the highest susceptibility rate (23.9%, n = 37) followed by amikacin (11.6%, n = 18).

All isolates showed the presence of *bla*_{OXA-51-like} gene, originally intrinsic to *A. baumannii*, and none were positive for *bla*_{OXA-24-like},

*bla*_{OXA-58-like}, and *bla*_{OXA-143-like}. The presence of *bla*_{OXA-23-like} gene was confirmed in most carbapenem-resistant isolates (n = 146; 94.2%), and the *ISAbal* element was detected upstream of the *bla*_{OXA-23} gene in almost all OXA-23-producing isolates. By additional screening, genes encoding for KPC and NDM were not found.

By MIC results, all OXA-23-producing isolates were highly resistant to carbapenem (MIC >32 µg/mL) except for 1 isolate that showed a MIC of 2.0 µg/mL for meropenem. For polymyxin B, MIC range was 0.19–0.50 µg/mL, and MIC₅₀/MIC₉₀ values were of 0.38/0.50 µg/mL, respectively. Considering tigecycline, MIC range was 0.19–6 µg/mL, and MIC₅₀/MIC₉₀ values were of 3/6 µg/mL, respectively. Among the 9 isolates non-OXA-23-producing, 5 were resistant to imipenem and/or meropenem, and the *ISAbal* element was found upstream of the *bla*_{OXA-51} gene by PCR mapping.

3.2. Molecular typing

Based on PFGE analysis, the 146 OXA-23-producing isolates were clustered into 28 genotypes (Table 1). The most prevalent was Ab1 (37.4% of isolates; n = 58) found in 8 states belonging to different geographical regions (DF, ES, GO, MG, RJ, RN, SC, and MS), followed by Ab2 (18.7%; n = 29) found in GO and MS and genotype Ab3 (9.7%; n = 15) found in 5 states (DF, ES, MG, RJ, and RN).

MLST performed on 44 isolates representing PFGE OXA-23-producing clones, including isolates from each state, allowed us to identify 13 sequence types (STs) as shown in the Table 1. Four new STs were first described in our study and were deposited in the MLST database (ST316, ST317, ST318, and ST319). The most prevalent PFGE profiles Ab1, Ab2, and Ab3 were designated ST15, ST1, and ST79, respectively. The ST1 was found in Midwest (GO, MS), Northeast (RN), and Southeast (MG). In RJ, we also identified ST160 (genotype Ab21), ST162 (genotype Ab8 and Ab9), ST188 (genotype Ab6), and ST316 (genotype Ab20). In the North (AM), Midwest (MS), and Southeast (MG, RJ), we also observed the ST25 (genotype Ab27, Ab28, and Ab29).

By eBURST, we found 6 major complexes (CC1, CC15, CC25, CC33, CC79, and CC162), which included mainly single-locus variants or, less commonly, double-locus variants (Fig. 1). Some STs described in this study were singletons (ST107 and ST319). Phylogenetic analysis showed that ST79 and ST15 belong to the CC79 and CC15, respectively. The CC15 (ST15 and ST318) was described in 9 of 10 Brazilian states studied (AL, DF, ES, GO, MG, RJ, RN, SC, and MS) belonging to the 4 different geographical regions of the country. The OXA-23-producing isolates belonging CC79 (ST79) were found in 8 of 10 states (AL, DF, ES, GO, MS, MG, RJ, and RN). The ST1 and ST160 were grouped in CC1 observed in GO, MG, MS, RJ, and RN. Other CCs were found into our isolates (CC25, CC33, and CC162) as observed in Fig. 1, and the distribution of them may be observed in Fig. 2.

4. Discussion

This study described the resistance profiles and genetic relatedness of CRAB isolates collected in different Brazilian hospitals during 3 years beginning in February 2008. In recent years, *A. baumannii* has been commonly reported as resistant to multiple drugs, and the resistance rates to imipenem, meropenem, ceftazidime, piperacillin/tazobactam, ciprofloxacin, and gentamicin in Latin America seem to be among the world's largest (Peleg et al., 2008). Antimicrobial Surveillance Program involving Latin America, imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. rates increased from 6.4%, 12.6%, and 0.0% in the 1997–1999 to 84.9%, 71.4%, and 50.0% in 2008–2010, respectively, in Argentina, Brazil, and Chile (Gales et al., 2012). *A. baumannii* MDR has also been reported in some countries in South America, such as Brazil, Argentina, and Colombia (Fiorilli et al., 2010; Villegas et al., 2007). All the *A. baumannii* clinical isolates included in this study were MDR,

Table 1
Molecular typing analysis and detection of *ISAbal* of OXA-23-producing *A. baumannii* from different states in Brazil.

Genotype	Isolate	ST	Allelic profile	CC	States	Year	<i>ISAbal</i> -upstream <i>bla</i> _{OXA-51-like}	<i>ISAbal</i> -upstream <i>bla</i> _{OXA-23-like}
Ab1	CCBH4902	15	6-6-8-2-3-5-4	CC15	RJ	2009	+	+
	CCBH4971				GO	2009	–	–
	CCBH5233				ES	2009	–	+
	CCBH5471				MS	2010	–	+
	CCBH5881				MG	2010	+	+
	CCBH6006				DF	2010	+	+
Ab2	CCBH6890	1	1-1-1-1-5-1-1	CC1	RN	2011	+	+
	CCBH6959				SC	2011	–	+
	CCBH5343				GO	2009	–	+
	CCBH5468				MS	2010	–	–
	CCBH4808				RJ	2008	+	+
	CCBH5791				MG	2010	+	+
Ab3	CCBH6009	79	26-2-2-29-4-5	CC79	DF	2010	+	+
	CCBH6872				ES	2010	–	+
	CCBH6887				RN	2011	–	+
Ab4	CCBH4818	79	26-2-2-29-4-5	CC79	RJ	2008	+	+
	CCBH5231				ES	2009	–	+
	CCBH6554				AL	2010	–	+
Ab5	CCBH5164	107	34-35-37-1-5-6-36	–	ES	2009	–	–
Ab6	CCBH5405	188	1-3-6-1-3-4-4	–	RJ	2009	–	+
Ab7	CCBH5470	79	26-2-2-2-29-4-5	CC79	MS	2010	+	+
Ab8	CCBH4819	162	3-2-2-2-2-4-8	CC162	RJ	2008	–	+
Ab9	CCBH4900	162	3-2-2-2-2-4-8	CC162	RJ	2009	–	+
	CCBH5472				MS	2010	–	+
Ab10	CCBH5639	151	27-5-7-1-7-1-4	CC33	ES	2010	–	+
Ab11	CCBH5792	1	1-1-1-1-5-1-1	CC1	MG	2010	+	+
	CCBH6893				RN	2011	–	+
Ab12	CCBH5162	79	26-2-2-2-29-4-5	CC79	ES	2009	+	+
Ab14	CCBH5337	79	26-2-2-2-29-4-5	CC79	GO	2009	–	–
Ab15	CCBH5338	1	1-1-1-1-5-1-1	CC1	GO	2009	+	–
Ab16	CCBH5642	79	26-2-2-2-29-4-5	CC79	ES	2010	+	+
Ab17	CCBH5036	317	3-1-15-2-40-4-4	–	ES	2009	–	+
Ab19	CCBH5054	25	3-3-2-4-7-2-4	CC25	AM	2009	–	–
Ab20	CCBH4816	316	3-1-6-2-4-1-5	–	RJ	2008	+	+
Ab21	CCBH4800	160	1-1-1-1-5-1-41	CC1	RJ	2008	+	+
Ab22	CCBH5361	79	26-2-2-2-29-4-5	CC79	ES	2009	+	+
Ab24	CCBH5790	318	6-6-8-2-3-5-5	CC15	MG	2010	+	+
Ab25	CCBH4825	316	3-1-6-2-4-1-5	–	RJ	2008	–	+
Ab26	CCBH5258	319	3-1-2-2-7-1-5	–	MG	2009	–	+
Ab27	CCBH5255	25	3-3-2-4-7-2-4	CC25	MG	2009	+	+
Ab28	CCBH4797	25	3-3-2-4-7-2-4	CC25	RJ	2008	–	+
Ab29	CCBH5475	25	3-3-2-4-7-2-4	CC25	MS	2010	+	+
Ab32	CCBH5218	318	6-6-8-2-3-5-5	CC15	MG	2009	+	+
Ab33	CCBH6558	15	6-6-8-2-3-5-4	CC15	AL	2010	+	+

which constitute a therapeutic problem of serious concern and affect the clinical outcome of serious infections caused by such pathogens.

In this work, we noted that the carbapenem resistance mediated by the enzyme OXA-23 was found in most isolates from different Brazilian states, confirming several reports of outbreaks *A. baumannii* that have this mechanism of resistance (Carvalho et al., 2009). According to Clímaco et al (2013), the spread of OXA-23 is most likely due to mobile elements (i.e., plasmids, transposons, insertion sequence). In previous report, we showed that the *bla*_{OXA-23} gene was consistently associated with transposon, Tn2006, and was chromosomally encoded in all carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates studied (Grosso et al., 2011). Our results also indicated that some isolates carried the *bla*_{OXA-23-like} gene with an *ISAbal* upstream, and these findings are in accordance with the results of other studies. As previously demonstrated by European and Brazilian reports (Pagano et al., 2013), the degree of carbapenem resistance in *A. baumannii* isolates may be accentuated by the presence of promoter sequences provided by *ISAbal*, leading to expression of the OXA-23.

Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene has been associated with specific clones. The study revealed that the most prevalent PFGE profiles Ab1 (n = 58 isolates) and other genotypes (Ab1, Ab24, Ab32, and Ab33) belonged to CC15 (ST15 and ST318) from 9 Brazilian states. According Diancourt et al. (2010), *A. baumannii* belonging to ST15 have experienced evolutionary success

and almost universally exhibit MDR phenotypes, which facilitated their rapid clonal expansion during recent years. This complex has been identified in several European countries, including Italy, Spain, Greece, and Turkey (Di Popolo et al., 2011, Gogou et al., 2011; Villalon et al., 2011).

In Latin America (Argentina and Brazil), OXA-23-producing *A. baumannii* strains have been commonly reported as belonging to CC79 (Grosso et al., 2011, Martins et al., 2013; Stietz et al., 2013). We characterized the CC79 in 8 Brazilian states representing the second major clonal complex in the country, followed by CC1. This CC1 is designated as the second major *A. baumannii* clone with a broad international distribution (Karah et al., 2012). We and other previous reports described the ST79 and ST15 in public and private hospitals in RJ (Southeast) (Grosso et al., 2011; Martins et al., 2013). In the current study, we showed that these STs were also disseminated along the country over the past 3 years.

Despite of non-OXA-23-producing, we found 5 carbapenem-resistant isolates, and these results may be explained by the presence of the *ISAbal* element upstream the *bla*_{OXA-51-like} gene. As reported by other studies, the reduced susceptibility to carbapenems in non-OXA-23 isolates may be mediated by gene *bla*_{OXA-51-like}, which is normally little expressed. However, the presence of the insertion sequence *ISAbal* or *ISAbal9* is required for increased expression associated with other mechanisms such as reduced permeability of the outer

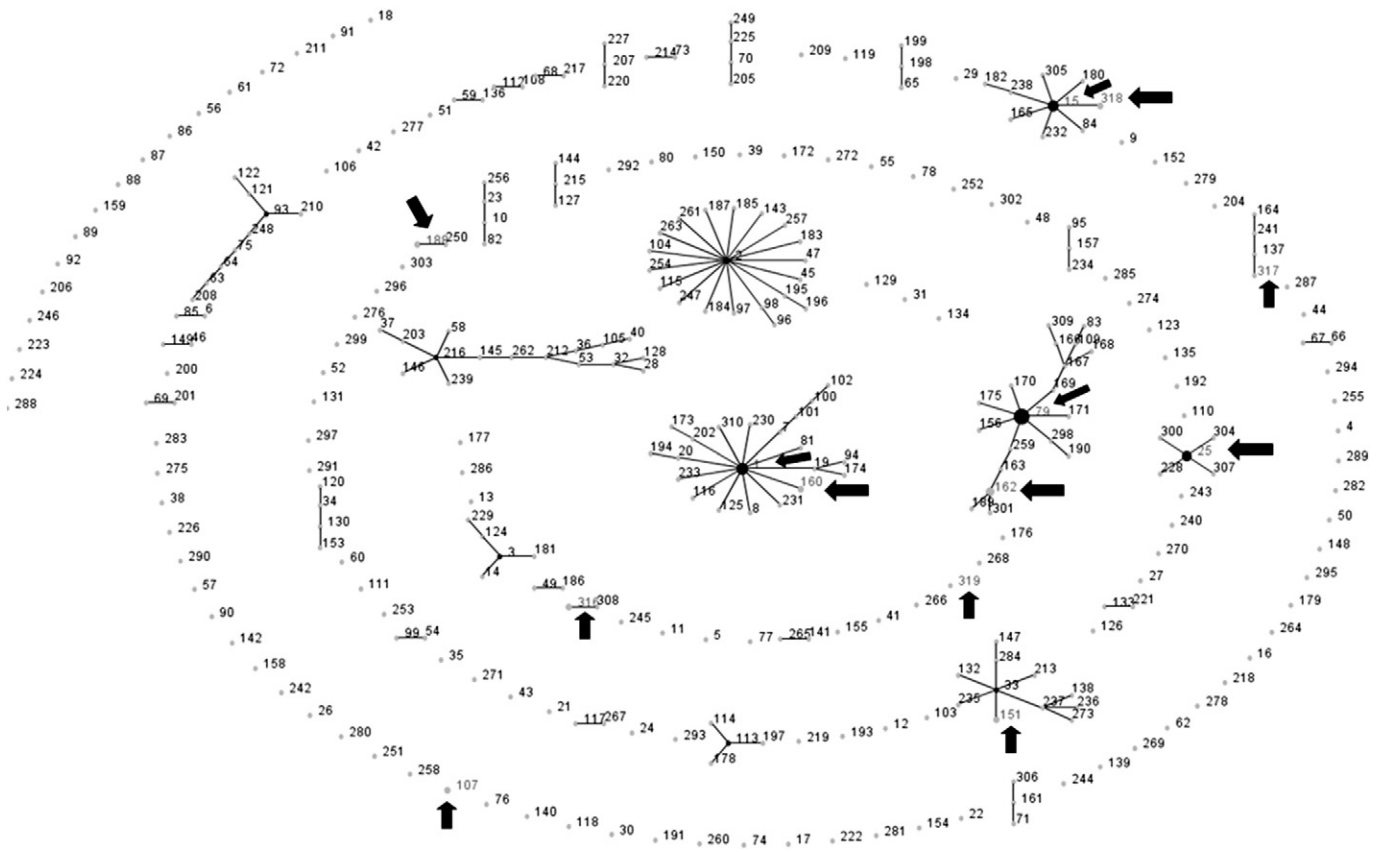


Fig. 1. Relatedness of OXA-23-producing *A. baumannii* STs by eBurst analysis. Each ST is represented by a dot in proportional size to the number of *A. baumannii* involved, considering all data in the Pasteur database. STs related in this study are indicated by arrows.

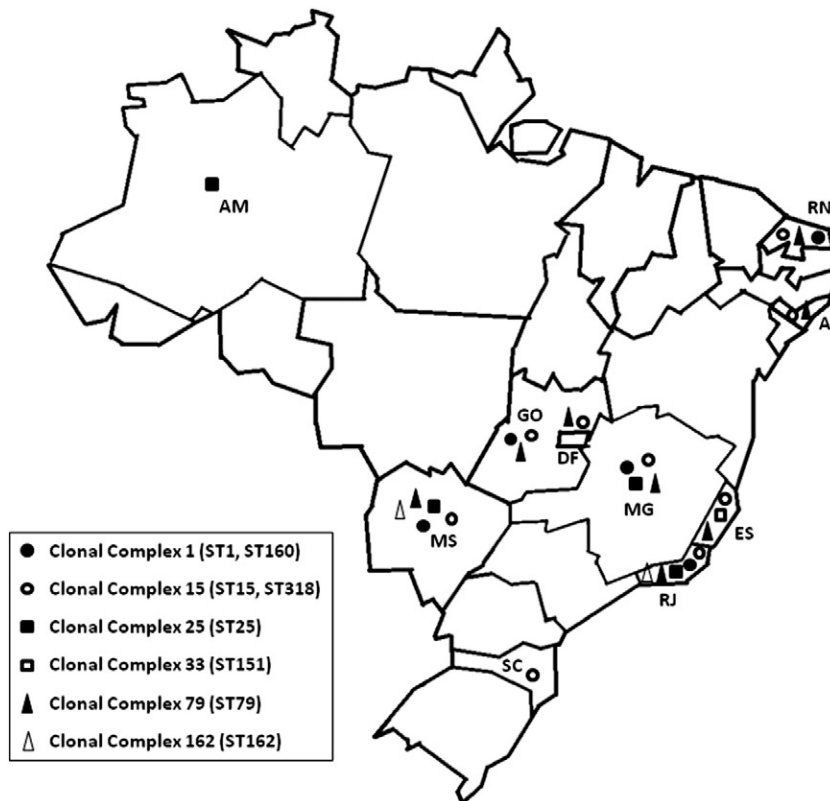


Fig. 2. Geographical distribution of CCs detected in different Brazilian states.

membrane or over expression of efflux pumps (Figueiredo and Poirel, 2009; Nordmann et al., 2011).

In conclusion, we report here the presence of MDR *A. baumannii* carrying the same carbapenem-resistance determinant (*bla*_{OXA-23} gene) with clonal country widespread dissemination of CC15 and CC79. These results confirmed the wide geographical distribution of OXA-23 among clinical carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates in Brazil. The dissemination of these major clusters of MDR *A. baumannii* in different states harboring *bla*_{OXA-23} gene illustrated the success that this organism has to acquire carbapenem resistance and emphasizes the importance of having effective control measures. Until now, few reports have focused on *A. baumannii* in all geographical regions of Brazil, mainly descriptions of local outbreaks. This is the first study that attempt to determine the Brazilian countrywide spread of MDR *A. baumannii* harboring the *bla*_{OXA-23} gene in different regions of Brazil.

Acknowledgments

We thank platform Genotyping of Pathogens and Public Health (Institute Pasteur, Paris, France) for coding MLST alleles and profiles and PDTIS-IOC DNA Sequencing Platform for DNA sequencing. We also thank the microbiologists who provided the strains from the Public Health Laboratories (LACENS): Ivoneide Barroso (AL), Ana Lúcia de Souza (AM), Celso Faria Junior (DF), Hilda Ramos Ruf (BA), Maria da Penha Herkenhoff (ES), Robmary de Almeida (GO), Carlene Alves (MG), Maria Pia (RJ), Ana Karine da Silva Vale (RN), Rita Bertoncini (SC); and Marilene R. Chang (UFMS).

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, and PAPES/Oswaldo Cruz Institute.

References

- Carvalho KR, Carvalho-Assef APD, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:25–8.
- Chaulagain BP, Jang SJ, Ahn GY, Ryu SY, Kim DM, Park G, et al. Molecular epidemiology of an outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbA1-*bla*_{OXA-51}-like genes in a Korean hospital. *Jpn J Infect Dis* 2012;65:162–6.
- Clímaco EC, Oliveira ML, Pitondo-Silva A, Oliveira MG, Medeiros M, Lincopan N, et al. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. *Infect Genet Evol* 2013;19C:127–33.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement. Wayne, PA: CLSI; 2012.
- Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003;41:3403–6.
- Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE* 2010;5:e10034.
- Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrilli R. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries using a multilocus sequencing typing scheme. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:197–201.
- Figueiredo S, Poirel L. Overexpression of the naturally occurring *bla*_{OXA-51} gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAbA9. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;52:4045–7.
- Fiorilli G, Faccone D, Lopardo H, Callejo R, Rapoport M, Prieto M, et al. Emergence of metallo-beta-lactamases in *Acinetobacter* spp clinical isolates from Argentina. *Rev Esp Quimioter* 2010;23:100–2.
- Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:354–60.
- Gogou V, Pournaras S, Giannouli M, Voulgari E, Piperaki ET, Zarrilli R, et al. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000–09). *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2767–72.
- Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef AP, Asensi MD, et al. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J Antimicrob Chemother* 2011;66:62–5.
- Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology* 2009;155:2333–41.
- Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:305–14.
- Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat* 2012;15:237–47.
- Martins N, Martins IS, de Freitas WV, de Matos JA, Girão VB, Coelho-Souza T, et al. Imported and intensive care unit-born *Acinetobacter baumannii* clonal complexes: one-year prospective cohort study in intensive care patients. *Microb Drug Resist* 2013;19:216–23.
- Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartique MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1257–63.
- Nordmann P, Poirel L, Carrère A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol* 2011;49:718–21.
- Pagano M, Martins AF, Machado AB, Barin J, Barth AL. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbA1 upstream *bla*_{OXA-51}-like gene in Porto Alegre, Southern Brazil. *Epidemiol Infect* 2013;141:330–3.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:538–82.
- Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolysing β -lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 2005;3:117–27.
- Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:826–36.
- Stietz MS, Ramírez MS, Vilacoba E, Merckier AK, Limansky AS, Centrón D, et al. *Acinetobacter baumannii* extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I–III. *Infect Genet Evol* 2013;14:294–301.
- Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Piker R, Livermore DM, et al. The role of ISAbA1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;258:72–7.
- Vanechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1995;33:11–5.
- Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J Clin Microbiol* 2011;49:875–82.
- Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2001–4.
- Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41:11–9.

Draft genome sequence of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST15 (CC15) isolated from Brazil

Thiago Pavoni Gomes Chagas^{1/+}, Melise Chaves Silveira², Rodolpho Mattos Albano³, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef¹, Marise Dutra Asensi¹

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Bioquímica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Acinetobacter baumannii is an important pathogen frequently associated with nosocomial outbreaks around the world. In Brazil, *A. baumannii* has become particularly problematic because of its prevalence and the carbapenems resistance. Here, we report the draft genome sequence of a multidrug-resistant *A. baumannii* (ST15/CC15) isolated in 2009 from the state of Espírito Santo (Southeast Brazil). We observed important resistance determinant genes in an estimated genome size of 4,102,788 bp with 3,862 predicted coding regions. A detailed report of the genomic data analysis might help to understand the specific features of highly successful strains belonged to a relevant complex clonal in different Brazilian geographical regions.

Key words: carbapenem-resistance - OXA-23 - *Acinetobacter baumannii* - Brazil - genome sequence

Acinetobacter baumannii is an important Gram-negative pathogen frequently associated with nosocomial outbreaks worldwide and highly capable of surviving and spreading in the hospital environment. This pathogen may present high rates of multi-drug resistance including aminoglycosides and fluoroquinolones. Carbapenems usually have good potency against *A. baumannii*, but carbapenem resistance has been increasingly reported in several countries during the last decade (Migliavacca et al. 2013). Carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases of the oxacilinas are the most important cause of carbapenem resistance in *A. baumannii* around the world (Zarrilli et al. 2013).

In Brazil, *A. baumannii* has become particularly problematic because of its prevalence and the carbapenems resistance, usually related to oxacilinas, mostly involving OXA-23 producers (Carvalho et al. 2009). Previous study reported the dissemination of two major clusters, clonal complexes (CC) 15 and 79, of multi-drug-resistant *A. baumannii* in different Brazilian states harbouring *bla*_{OXA-23} gene. The CC15 was described in nine Brazilian states [Alagoas, Distrito Federal, Espírito Santo (ES), Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Santa Catarina and Mato Grosso do Sul] belonging to the four different geographical regions of the country (Chagas et al. 2014).

This report announces the draft genome sequence of *A. baumannii* CCBH5233 isolated in 2009 from a hospitalised patient in ES (Southeast Brazil) and deposited in the Culture Collection of Hospital-Acquired Bacteria (CCBH) located at the Hospital Infection Research Laboratory (Oswaldo Cruz Institute/Oswaldo Cruz Foundation). This strain displayed a multidrug resistance profile, which included resistance to ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam, ampicillin/sulbactam, ceftazidime, cefepime, amikacin, sulfamethoxazole-trimethoprim, meropenem and imipenem, with the exception of polymyxin B. According to polymerase chain reaction (PCR) analysis (Higgins et al. 2013), *A. baumannii* CCBH5233 has *bla*_{OXA-51-like}, originally intrinsic to *A. baumannii* and *bla*_{OXA-23-like} genes. Previous multilocus sequence typing (MLST) analysis (Diancourt et al. 2010) showed that the strain belongs to sequence type (ST) 15/CC15 (according to MLST scheme developed by Pasteur Institute) (Chagas et al. 2014).

Genomic DNA was extracted using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany) and sequenced using an Illumina MiSeq sequencing platform (Illumina Inc, USA). A genomic library was constructed by transposon tagmentation with the Nextera XT DNA Sample Prep kit (Illumina Inc). The data were filtered and trimmed to a Phred score of > 20 and were assembled *de novo* using the Velvet algorithms (Zerbino & Birney 2008). Seventy-six contigs were generated and genome annotation was performed on the Rapid Annotation using System Technology (RAST) v.2.0 (available from rast.nmpdr.org/). By RAST, 3,862 coding sequences were annotated from the genome with estimated size of 4,102,788 bp. According to tRNAScan-SE (Schattner et al. 2005) and RNAmmer (Lagesen et al. 2007) analysis we identified 66 tRNAs and eight rRNAs, respectively. *A. baumannii* contigs were analysed using ResFinder 2.1 (available from cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/) which identifies acquired antimicrobial resistance genes in total or partial

doi: 10.1590/0074-02760150158

Financial support: CNPq, FAPERJ, IOC (PAPES-FIOCRUZ)

+ Corresponding author: thiagopavoni@gmail.com

Received 21 April 2015

Accepted 15 June 2015

sequenced isolates of bacteria (Zankari et al. 2012). Using this approach, we observed resistance genes to beta-lactams [*bla*_{OXA-51} (LAXF01000004; 277,103-277,927 bp), *bla*_{OXA-23} (LAXF01000049; 9,858-10,679 bp) and *bla*_{TEM-1} (LAXF01000047; 5,481-6,341 bp)], to aminoglycosides [*aphA(6)* (LAXF01000061; 273-1,052 bp) and *aac(3)-IIa* (LAXF01000047; 4,538-5,339 bp)] and to sulphonamide [*sul2* (LAXF01000056; 2,580-3,395 bp)].

In order to confirm the result obtained by traditional PCR-based MLST, *A. baumannii* contigs were analysed by MLST 1.7 server of Center for Genetic Epidemiology (available from cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/) (Larsen et al. 2012). The MLST 1.7 results showed that CCBH5233 belongs to ST15/CC15 (MLST scheme developed by Pasteur Institute) and ST236/CC104 (MLST scheme developed by University of Oxford). Additional molecular typing was performed using *Acinetobacter baumannii* Sequence Typing server (available from hpa-bioinformatics.org.uk/AB/ab_type1.php) by searching and comparing the regions of *ompA*, *csuE* and *bla*_{OXA-51} (Turton et al. 2007). Using this additional typing, our strain was defined as ST502.

In summary, we reported whole-genome sequencing of the *A. baumannii* ST15 (CC15) harbouring *bla*_{OXA-23} and a detailed genomic analysis will be provided in future studies. In the context of resistance characteristics, genes relevant to *Acinetobacter* could be identified by whole genome sequencing approaches. A detailed report of the genomic data analysis might help to understand the specific features of successful strains belonging to an important complex clonal in Brazil.

This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DNA DataBank of Japan/European Molecular Biology Laboratory/GenBank under the accession LAXF00000000. The version described in this paper is version LAXF01000000.

REFERENCES

- Carvalho KR, Carvalho-Assef APD, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD 2009. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*_{OXA-23} collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 34: 25-28.
- Chagas TP, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef AP, Asensi MD 2014. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis* 79: 468-472.
- Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L, Brisse S 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE* 5: e10034.
- Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Staerfeldt HH, Rognes T, Ussery DW 2007. RNAMmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* 35: 3100-3108.
- Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H 2013. OXA-235, a novel class D β-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2121-2126.
- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O 2012. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 50: 1355-1361.
- Migliavacca R, Espinal P, Principe L, Drago M, Fugazza G, Roca I, Nucleo E, Bracco S, Vila J, Pagani L, Luzzaro F 2013. Characterization of resistance mechanisms and genetic relatedness of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from blood, Italy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75: 180-186.
- Schattner P, Brooks AN, Lowe TM 2005. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucleic Acids Res* 33: 686-689.
- Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL 2007. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 13: 807-815.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67: 2640-2644.
- Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 41: 11-19.
- Zerbino DR, Birney E 2008. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 18: 821-829.



Letter to the Editor

Detection of an NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* strain in Brazil

Sir,

NDM (New Delhi metallo- β -lactamase) was first reported in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in 2009 [1]. Since then, bla_{NDM} -positive bacteria have been disseminated worldwide. In *Acinetobacter*, the bla_{NDM} gene was identified in various regions of the world, including India, China, Egypt, France and Paraguay [2]. In Brazil, the first case of NDM in *Acinetobacter* was reported in 2014 in *Acinetobacter baumannii* from the state of Paraná (Southern Brazil) [2]. Here we report, to our knowledge, the first description of NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* in Brazil, South America.

Acinetobacter bereziniae, previously known as *Acinetobacter* genomic species 10, has been responsible for healthcare-associated infections and has been isolated more rarely from various other sources, including soil, animals and vegetables [3]. Until now, carbapenem-resistant *A. bereziniae* carrying bla_{NDM} has been reported only in Asia (China, India and Pakistan) [4,5].

In this study, a carbapenem-resistant *A. bereziniae* was recovered from a blood sample of a 21-year-old hospitalised male patient admitted to hospital from the State of Santa Catarina, Southern Brazil, in April 2014. The *Acinetobacter* strain was previously identified according to conventional biochemical tests, morphological and growth characteristics, and 16S rRNA gene sequencing. Final species identification was performed by *rpoB* gene sequencing analysis (KR107539).

According to susceptibility tests conducted using the agar diffusion method and Etest (AB bioMérieux, Solna, Sweden) and interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [6], a multidrug resistance profile was observed, which included resistance to ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam, ceftazidime, cefepime, amikacin, sulfamethoxazole/trimethoprim, ertapenem [minimum inhibitory concentrations (MICs) > 32 μ g/mL], meropenem (MIC > 32 μ g/mL) and imipenem (MIC > 32 μ g/mL). The isolate was susceptible to polymyxin B with an MIC of 0.50 μ g/mL. Screening for metallo- β -lactamase production showed a positive result with imipenem/ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) [7].

OXA-like carbapenemases, the most widespread mechanism resulting in carbapenem resistance in *Acinetobacter* spp. (bla_{OXA-23} -like, bla_{OXA-24} -like, bla_{OXA-58} -like, $bla_{OXA-143}$ -like and $bla_{OXA-235}$ -like), were not detected by multiplex PCR. PCR screening for other carbapenemase genes (bla_{NDM} , bla_{KPC} , bla_{OXA-48} -like, bla_{VIM} , bla_{IMP}

and bla_{SPM}) followed by DNA sequencing showed the presence of bla_{NDM-1} . To identify the location of this gene, plasmid analysis by alkaline lysis methodology and Southern blot hybridisation with digoxigenin-labelled probes of resistance genes found, generated by the PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), were performed. The bla_{NDM-1} -carrying plasmid observed was ca. 41 kb, similar to the bla_{NDM-1} -carrying plasmids in *Acinetobacter* strains isolated from Asia (30–55 kb) [4,5], but smaller than the bla_{NDM-1} -carrying plasmid described in *A. baumannii* isolated from Brazil [2]. *Acinetobacter baumannii* was the most common NDM-1-producing *Acinetobacter* spp., and the bla_{NDM-1} gene was mostly chromosomally located [8]. However, NDM-producing *Acinetobacter* isolates have been recently reported with bla_{NDM} gene-bearing plasmids [2,4,5,8].

To obtain a comprehensive view of the genetic context of bla_{NDM-1} , *A. bereziniae* genomic sequencing was performed on an Illumina HiSeq™ system (Illumina Inc., San Diego, CA). Contigs obtained with Velvet algorithms were used for Blast searches against GenBank. The genetic environment of bla_{NDM-1} has been observed to be very similar to that described previously in NDM-producing *Acinetobacter haemolyticus* (JQ080305.2) isolated from China [4]. The bla_{NDM-1} gene was located inside a type 1 transposon Tn125. This type of transposon is common in *Acinetobacter* species, including *Acinetobacter junii*, *A. haemolyticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter* genomic species 15TU, and contained an integral Tn125 structure (ISAb125- bla_{NDM-1} -bleo-trpF-dsbC-cutA1-groES-groEL-ISCR27-ISAb125) [4].

For additional screening of other antibiotic resistance genes, the *A. bereziniae* contigs were submitted to the ResFinder database (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), with a 98% threshold for identification of genes. This allowed us to identify aminoglycoside resistance genes (*strA*, *aphA6*, *aadB* and *strB*) and tetracycline resistance genes (*tetA*). Considering β -lactamase-encoding genes, $bla_{OXA-229}$, a variant of the intrinsic OXA-228-like, was also observed. Carbapenem resistance in *A. bereziniae* has also previously been associated with the metallo- β -lactamases IMP, SIM and VIM or overexpression of class D β -lactamases (OXA-228-like) [3].

Reports of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. carrying bla_{NDM} are increasing worldwide. In summary, we showed an association of this gene with *A. bereziniae*, a species that is rarely found in human clinical specimens. Detection of NDM in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. and its plasmid environment (ISAb125-associated transposon) suggests that this species may serve as a reservoir for transferring NDM-1 and other resistance genes to other bacterial species such as Enterobacteriaceae.

Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas

* This report was presented in part at the 4th Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica [International Symposium of Clinical Microbiology], 22–24 October 2014, João Pessoa, Paraíba State, Brazil [abstract/poster 197-1].

Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Oswaldo Cruz Institute (PAPES-FIOCRUZ).

Conflict of interest

None declared.

Ethical approval

Not required.

Acknowledgments

The authors thank PDTIS and High-throughput Platform (Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz) for DNA sequencing.

References

- [1] Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5046–54.
- [2] Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TPG, Carvalho-Assef AP, et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:7592–4.
- [3] Zander E, Seifert H, Higgins PG. Insertion sequence IS18 mediates overexpression of *bla*_{OXA-257} in a carbapenem-resistant *Acinetobacter bereziniae* isolate. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:270–1.
- [4] Fu Y, Liu L, Li X, Chen Y, Jiang Y, Wang Y, et al. Spread of a common *bla*_{NDM-1}-carrying plasmid among diverse *Acinetobacter* species. *Infect Genet Evol* 2015;32:30–3.
- [5] Jones LS, Carvalho MJ, Toleman MA, White PL, Connor TR, Mushtaq A, et al. Characterization of plasmids in extensively drug-resistant *Acinetobacter* strains isolated in India and Pakistan. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:923–9.
- [6] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement. Document M100-S24. Wayne, PA: CLSI; 2014.
- [7] Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo- β -lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2012;50:1419–21.
- [8] Yang J, Chen Y, Jia X, Luo Y, Song Q, Zhao W, et al. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:E506–13.

Thiago Pavoni Gomes Chagas
Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef
Caio Augusto Martins Aires
*Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), Instituto
Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

Rita Bertocini
*Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC),
Florianópolis, SC, Brazil*

Marise Dutra Asensi*
*Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), Instituto
Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

*Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 1636;
fax: +55 21 2562 1634
E-mail address: marise@ioc.fiocruz.br (M.D. Asensi).

17 March 2015