

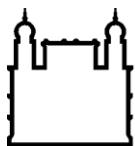
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

INFECÇÕES HOSPITALARES E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE  
*Acinetobacter baumannii* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS DE  
BOA VISTA, RORAIMA

RAQUEL VOGES CALDART

Rio de Janeiro  
Setembro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*RAQUEL VOGES CALDART*

Infecções hospitalares e caracterização genética de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos de Boa Vista, Roraima

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Parasitária

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Paulo Vicente

**RIO DE JANEIRO**  
Setembro de 2020

Caldart, Raquel Voges.

Infecções hospitalares e caracterização genética de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos de Boa Vista, Roraima / Raquel Voges Caldart, Ana Carolina Paulo Vicente - Rio de Janeiro, 2020.

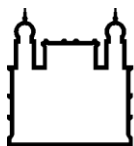
xvii, 120f. f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientadora: Ana Carolina Paulo Vicente.

Bibliografia: f. 80-111

1. Infecção hospitalar. 2. *Acinetobacter baumannii*. 3. Resistência aos antimicrobianos. 4. Carbapenemases. 5. Região Amazônica. I. Vicente, Ana Carolina Paulo . II. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***RAQUEL VOGES CALDART***

### **INFECÇÕES HOSPITALARES E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Acinetobacter baumannii* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS DE BOA VISTA, RORAIMA**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Paulo Vicente**

**Aprovada em: 16/09/2020**

#### **EXAMINADORES:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Verônica Viana Vieira - Presidente  
Instituto Oswaldo Cruz (IOC - FIOCRUZ)

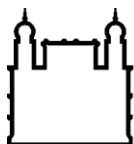
Prof. Dr. Thiago Pavoni Gomes Chagas  
Universidade Federal Fluminense (UFF)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreza Francisco Martins  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

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

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Pagano  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC - RS)

Rio de Janeiro, 16 de setembro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de Raquel Voges Caldart, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Paulo Vicente . Ao décimo sexto dia do mês de setembro de dois mil e vinte, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado intitulada: **“INFECÇÕES HOSPITALARES E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Acinetobacter baumannii* RESISTENTES AOS CARBAPENENS DE BOA VISTA/RR”**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Estudos Bioquímicos e Moleculares de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Verônica Viana Vieira – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Andreza Francisco Martins – UFRGS/RS, Dr. Thiago Pavoni Gomes Chagas – UFF/RJ e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Mariana Pagano - PUC/RS e Dr. Claudio Marcos Rocha de Souza - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela *aprovação* da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota, o Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 16 de setembro de 2020.

*Verônica Viana Vieira*  
Dr<sup>a</sup>. Verônica Viana Vieira (Presidente da Banca)

*Rafael Maciel de Freitas*  
Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

À Amália e ao João Ernesto

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela oportunidade de chegar até aqui.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup> Ana Carolina, pela confiança, pelas orientações e ensinamentos, pela paciência, incentivo e pelo carinho dedicado durante esses anos.

A equipe do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, Dr<sup>a</sup> Érica e Fernanda pela parceria e colaboração na realização deste trabalho.

A equipe do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Geral de Roraima, em especial a enfermeira Regiany, pela presteza e disponibilidade em fornecer as informações sempre que precisei.

A equipe do Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima, em especial a Cátia por abrir as portas e permitir a realização dessa pesquisa e a Luiza, pela parceria e disponibilidade que tornaram possível a realização desse projeto.

A Dr<sup>a</sup> Verônica pela revisão desta tese e contribuições para a melhoria deste trabalho.

Aos membros da banca, Dr. Thiago, Dr<sup>a</sup> Andreza, Dr<sup>a</sup> Mariana e Dr. Cláudio por aceitarem contribuir com este trabalho.

Aos meus pais, em especial a minha mãe, Elizabete, pelo amor incondicional.

Ao meu marido, Mauricio pelo amor e companheirismo de longos anos e pelo apoio e incentivo durante toda essa jornada.

Aos meus filhos, Amália e João Ernesto que entenderam, cada um do seu jeitinho, meus momentos de ausência.

A minha irmã, Heloiza por ser essa dinda querida que segurou as pontas quando precisei.

Aos meus sogros, Izídio e Lourdes pelo suporte durante essa caminhada.

A toda minha família, em especial meus tios, Cristina, Vera, Sílvio e Eroteide por sempre torcerem por mim.

Aos colegas de turma do DINTER, em especial aos queridos Jaime e Luciano, pelo apoio, pela força e incentivo durante esses anos.

A Universidade Federal de Roraima, em especial ao curso de enfermagem pelo apoio dado durante o desenvolvimento desta pesquisa.

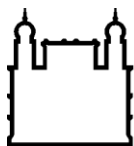
Aos alunos do curso de enfermagem da UFRR que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste projeto, em especial a Débora e a Fernanda.

A Fundação Oswaldo Cruz, em especial o Instituto Oswaldo Cruz e a Coordenação da Pós-graduação por proporcionar esse DINTER contribuindo com o desenvolvimento científico na região Norte do Brasil.

“O primeiro requisito de um hospital é que ele jamais deveria fazer mal ao doente”.

Florence Nightingale





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### INFECÇÕES HOSPITALARES E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Acinetobacter baumannii* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS DE BOA VISTA, RORAIMA

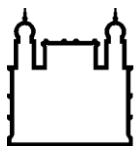
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Raquel Voges Caldart**

A infecção hospitalar é uma das questões centrais da saúde pública mundial. Sendo assim, esta pesquisa teve como objetivo principal investigar este tema em um hospital de referência de Boa Vista, Roraima, Amazônia brasileira que possui características geográficas e populacionais singulares em relação a outras capitais do Brasil. Caracterizamos aspectos clínicos e determinamos os perfis de resistência às drogas das principais espécies bacterianas relacionadas aos casos de infecção hospitalar. Em particular, determinamos a epidemiologia molecular de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos recuperados destes pacientes no período entre 2016 e 2018. Usamos as bases de dados do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar e do Laboratório Central de Saúde Pública para estabelecer perfis dos pacientes e infecções. O perfil de susceptibilidade antimicrobiana foi definido pelos métodos de difusão em disco e pela determinação da concentração inibitória mínima. A epidemiologia molecular de *A. baumannii* foi baseada nos perfis obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado e nos STs (sequências tipo). Os genes codificadores das  $\beta$ -lactamases das classes A, B e D foram rastreados e sequenciados. Dentre as características dos pacientes, destaca-se a prevalência de homens (61,4%), idosos (29,3%), pacientes internados em unidades de terapia intensiva (48,5%), com longo período de hospitalização (75,2%) e uso de antibióticos previamente a coleta de exame microbiológico (73,5%). Bactérias do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter species*) são as prevalentes nestas infecções (68,7%), com destaque para *A. baumannii* (22,6%). Dentre as amostras clínicas mais coletadas temos as do trato respiratório (42,8%). E em 73,3% dos pacientes isolou-se bactéria com perfil de multirresistência às drogas. Quanto às infecções por *A. baumannii*, essas foram mais prevalentes nas unidades de terapia intensiva (65,1%) tendo 52,8% destes pacientes evoluído para óbito. A análise dos 27 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos demonstrou que todos apresentavam sensibilidade apenas a colistina e tetraciclina e pertenciam a três clones internacionais, CI-1 (33,3%), CI-5 (44,5%) e CI-6 (22,2%), este último identificado pela primeira vez no Brasil no presente estudo. O principal determinante da resistência aos carbapenêmicos dos isolados deste estudo pertencentes aos CI-1 e CI-5 (77,8%) é o gene *bla<sub>OXA-23</sub>* associado a sequências de inserção do tipo IS*Aba*1 e IS*Aba*3, respectivamente, enquanto os isolados do CI-6 (22,2%) carregam o *bla<sub>OXA-72</sub>*. Esse estudo revelou que a epidemiologia das infecções hospitalares por *A. baumannii* em Boa Vista, região Amazônica, é semelhante as demais regiões metropolitanas do país assim como em outras partes do mundo.

Palavras-chave: infecção hospitalar, *Acinetobacter baumannii*, resistência aos antimicrobianos, carbapenemases, região Amazônica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### HOSPITAL INFECTIONS AND GENETIC CHARACTERIZATION OF CARBAPENEM-RESISTANT *Acinetobacter baumannii* IN BOA VISTA, RORAIMA, BRAZIL

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Raquel Voges Caldart

Hospital infection is one of the central issues of public health worldwide. The goal of this study was to assess this topic in a reference hospital of Boa Vista, State of Roraima, in the Brazilian Amazon region, which has unique geographical and population characteristics with respect to other capitals in Brazil. Clinical aspects were characterized, and drug resistance profiles of the main bacterial species related to cases of hospital infection were determined, particularly the molecular epidemiology of carbapenems-resistant *Acinetobacter baumannii* obtained from patients between 2016 and 2018. The profiles of patients and infections were determined using the databases of the Hospital Infection Control Service and the Central Public Health Laboratory. The antimicrobial susceptibility profiles were defined by disk diffusion methods and by determining the minimum inhibitory concentration. The molecular epidemiology of *A. baumannii* was based on the profiles obtained by pulsed field gel electrophoresis and type sequences. The genes encoding class A, B, and D  $\beta$ -lactamases were tracked and sequenced. Among the characteristics of the patients, there was prevalence of men (61,4%), older adults (29,3%), patients hospitalized in intensive care units (48,5%), patients with long hospital stays (75,2%), and patients with previous exposure to antibiotics (73,5%). Bacteria of the ESKAPE group (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter*) were the most prevalent in these infections (68,7%), especially *A. baumannii* (22,6%). The most collected clinical samples were those of the respiratory tract (42,8%), and bacteria with multidrug-resistant profiles were isolated in 73,3% of the patients. *A. baumannii* infections were more prevalent in intensive care units (65,1%), and 52,8% of those patients died. The analysis of the 27 carbapenems-resistant *A. baumannii* isolates indicated that all of them were sensitive only to colistin and tetracyclines, and belonged to three international clones, i.e., CI-1 (33,3%), CI-5 (44,5%), and CI-6 (22,2%), the latter having been identified for the first time in Brazil by the present study. The main determinant of carbapenems resistance of the isolates in this study belonging to CI-1 and CI-5 (77,8%) was the *bla*<sub>OXA-23</sub> gene associated with insertion sequences of the ISAb<sub>a</sub>1 and ISAb<sub>a</sub>3 type, respectively, whereas the CI-6 isolates (22,2%) carried *bla*<sub>OXA-72</sub>. This study indicated that the epidemiology of hospital infections caused by *A. baumannii* in Boa Vista, in the Amazon region, was similar to that occurring in other metropolitan regions of the country, as well as in other parts of the world.

Keywords: hospital infection, *Acinetobacter baumannii*, antimicrobial resistance, carbapenemases, Amazon region.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 <b>Infecção Hospitalar: aspectos gerais</b>	<b>1</b>
1.2 <b>Principais microrganismos causadores de infecção hospitalar</b>	<b>4</b>
1.2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> : características do gênero e da espécie	5
1.3 <b>Mecanismos de resistência associados aos <math>\beta</math>-lactâmicos</b>	<b>6</b>
1.3.1 $\beta$ -lactamases	9
1.3.1.1 $\beta$ -lactamases de classe A	10
1.3.1.2 $\beta$ -lactamases de classe B	11
1.3.1.3 $\beta$ -lactamases de classe D	13
1.3.2 Outros mecanismos de resistência em <i>A. baumannii</i>	18
1.3.2.1 Alteração das proteínas de ligação às penicilinas	18
1.3.2.2 Alteração na permeabilidade da membrana externa	19
1.3.2.3 Hiperexpressão de bombas de efluxo	20
1.4 <b>Transferência horizontal de genes de resistência aos antibióticos</b>	<b>21</b>
1.5 <b>Identificação laboratorial de carbapenemases</b>	<b>25</b>
1.5.1 Métodos fenotípicos	25
1.5.2 Reação em cadeia da polimerase para detecção de $\beta$ -lactamases	26
1.6 <b>Métodos de tipagem molecular</b>	<b>26</b>
1.6.1 <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> – PFGE	27
1.6.2 <i>Multilocus Sequence Typing</i> – MLST	28
1.6.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR	29
1.6.4 Sequenciamento completo do genoma – WGS	30
1.7 <b>Justificativa</b>	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
2.1 <b>Objetivo Geral</b>	<b>33</b>
2.2 <b>Objetivos Específicos</b>	<b>33</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
3.1 <b>Tipo e local do estudo</b>	<b>34</b>
3.2 <b>Coleta dos dados</b>	<b>34</b>
3.2.1 Coleta dos dados clínicos	35
3.2.2 Coleta do material microbiológico	35

<b>3.3</b>	<b>Procedimentos no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos.....</b>	<b>36</b>
3.3.1	Meios de cultura e soluções .....	36
3.3.2	Isolados bacterianos .....	37
3.3.3	Manutenção, estocagem e condições de estocagem dos isolados.....	37
3.3.4	Identificação dos isolados e teste de sensibilidade aos antibióticos .....	37
3.3.5	Detecção fenotípica de carbapenemases .....	38
3.3.6	Extração de DNA pelo método de choque térmico.....	39
3.3.7	Reação em cadeia da polimerase .....	39
3.3.8	Eletroforese em gel de agarose .....	41
3.3.9	Determinação das sequências nucleotídicas (sequenciamento).....	41
3.3.10	Tipagem molecular e determinação da clonalidade dos isolados de <i>A. baumannii</i> através da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado .....	41
3.3.11	Determinação do <i>Sequence Typing</i> pelo método de <i>Multilocus Sequence Typing</i>	43
<b>3.4</b>	<b>Definições e análise dos dados .....</b>	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>Aspectos éticos.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>46</b>
4.1	Descrição dos pacientes .....	46
4.2	Descrição das infecções.....	47
4.3	Resistência bacteriana aos antibióticos .....	51
4.4	Caracterização genética dos isolados de <i>A. baumannii</i> .....	55
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>80</b>
<b>9</b>	<b>APÊNDICES</b>	<b>112</b>
	<b>APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ</b>	<b>113</b>
	<b>APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF GLOBAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE</b>	<b>117</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de resistência aos antibióticos em bactérias do grupo ESKAPE. .....	8
Figura 2 - Representação de um elemento genético móvel .....	22
Figura 3 - Representação esquemática da metodologia. ....	44
Figura 4 - Percentual das principais classes de antibióticos prescritas previamente a coleta de material para análise microbiológica nos pacientes com infecção hospitalar no principal hospital de referência para adultos de Roraima. Boa Vista/RR, 2016-2018. .....	47
Figura 5 - Percentual dos principais patógenos provenientes dos casos de infecção hospitalar no principal hospital de referência para adultos de Roraima, segundo perfil de resistência às drogas, Boa Vista/RR, 2016-2018. ....	52
Figura 6 - Representação geográfica da distribuição dos principais clones internacionais de <i>A. baumannii</i> no Brasil. ....	72
Figura 7 - Representação geográfica da distribuição dos principais genes codificadores de CHDL em isolados de <i>A. baumannii</i> no Brasil.....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre dois os dois esquemas de classificação das $\beta$ -lactamases Ambler (1980) e Bush; Jacoby; Medeiros (1995). .....	10
Tabela 2 - Iniciadores utilizados neste estudo.....	40
Tabela 3 - Fatores demográficos e clínicos dos pacientes com infecção hospitalar internados no principal hospital de referência para adultos de Roraima, segundo agente etiológico. Boa Vista/RR, 2016-2018.....	48
Tabela 4 - Distribuição dos patógenos isolados de amostras clínicas coletadas dos pacientes com infecção hospitalar internados no principal hospital de referência para adultos de Roraima. Boa Vista/RR, 2016-2018.....	50
Tabela 5 - Percentual de antibióticos testados e resistência aos antibióticos dos isolados Gram-negativos pertencentes ao grupo ESKAPE mais <i>E. coli</i> provenientes dos casos de infecção hospitalar no principal hospital de referência para adultos de Roraima, Boa Vista/RR, 2016-2018. ....	53
Tabela 6 - Percentual de antibióticos testados e resistência aos antibióticos dos isolados Gram-positivos pertencentes ao grupo ESKAPE mais <i>S. epidermidis</i> provenientes dos casos de infecção hospitalar no principal hospital de referência para adultos de Roraima, Boa Vista/RR, 2016-2018.....	54
Tabela 7 - Características epidemiológicas, fenotípicas e genotípicas de isolados de <i>A. baumannii</i> XDR pertencentes aos Clones Internacionais em surtos ocorridos no principal hospital de referência para adultos de Roraima. Boa Vista/RR, 2016-2018. ....	57

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>Acb</i>	Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii</i>
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i>
AMK	Amicacina
AMP	Ampicilina
AMS	Ampicilina-sulbactam
AMX	Amoxicilina-ácido clavulânico
AP-PCR	<i>Arbitrary Primed</i>
ATCC	<i>American type and culture collection</i>
BGN	Bacilo Gram-negativo
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>bla</i>	Genes da $\beta$ -lactamase
CAZ	Ceftazidima
CC	Complexo Clonal
CE	Clone Europeu
CEF	Cefotaxima
CFO	Cefoxitina
CHDL	<i>Carbapenem-hydrolyzing class D <math>\beta</math>-lactamase</i>
CI	Clone Internacional
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLI	Clindamicina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COS	Colistina
CRAB	<i>Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii</i>
CRO	Ceftriaxona
CTX-M	<i>Cefotaxime hydrolyzing capabilities <math>\beta</math>-lactamase</i>
CXM	Cefuroxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DORI	Doripenem
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGM	Elemento Genético Móvel
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>
ERT	Ertapenem

ERY	Eritromicina
ESBL	<i>Extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamases</i>
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter species</i>
EUA	Estados Unidos da América
FEP	Cefepima
FOF	Ácido fusídico
GEN	Gentamicina
GES	<i>Guiana Extended Spectrum <math>\beta</math>-lactamase</i>
ICS	Infecção de corrente sanguínea
ICSRC	Infecção de Corrente Sanguínea Relacionada ao Cateter
IH	Infecção Hospitalar
IMI	Enzima hidrolisante imipenem
IMP	Imipenemase
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPN	Imipenem
IRAS	Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
IS	<i>Insertion Sequence</i>
ISAb <sub>a</sub>	Sequência de Inserção de <i>Acinetobacter baumannii</i>
ISC	Infecção de sítio cirúrgico
ITU-AC	Infecção do Trato Urinário Associada ao Cateter
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LGMM	Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos
LNZ	Linezolid
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MEM	Meropenem
MFX	Moxifloxacina
MIN	Minociclina
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MLST-IP	MLST desenvolvido pelo Instituto Pasteur
MLST-OD	MLST relacionado ao banco de dados Oxford
MLVA	<i>Multiplelocus variable-number tandem repeat analyses</i>
M $\beta$ L	Metalo- $\beta$ -lactamase



NaCl	Cloreto de Sódio
NDM	<i>New Delhi</i> metalo- $\beta$ -lactamase
NMC	<i>Non-metalloenzimatic carbapenemase</i>
OMP	<i>Outer membrane proteins</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilina
OXA	Oxacilinase
PAV	Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDR	<i>Pandrug-resistant</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
REP-PCR	Repetitive extragenic palindromic-PCR
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
RND	<i>Resistance-nodulation-division</i>
SCIH	Serviço de Controle de Infecção Hospitalar
SHV	<i>Sulphydryl variable <math>\beta</math>-lactamase</i>
SME	Enzima <i>Serratia marcescens</i>
SPM	São Paulo metalo- $\beta$ -lactamase
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
ST	<i>Sequence type</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprima
TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	Tetraciclina
TEI	Teicoplanina
TEM	Temoneira $\beta$ -lactamase
THM	Teste de Hodge Modificado
TIG	Tigeciclina
TIR	Ticarcilina-ácido clavulânico
TOB	Tobramicina
TSA	Agar triptona de soja
TZP	Piperacilina-tazobactam
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

VAN	Vancomicina
VIM	Verona imipenemase
WGS	<i>Whole-genome sequence</i>
XDR	<i>Extensively drug resistant</i>
Zn <sup>2+</sup>	Zinco

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Infecção Hospitalar: aspectos gerais

As infecções hospitalares (IH) também denominadas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são consideradas um evento adverso persistente nos serviços de saúde que geram impacto direto na segurança da assistência, constituindo-se um dos principais desafios mundiais para a qualidade dos cuidados em saúde (1–3).

No que se refere às medidas de prevenção e controle dessas infecções, os primeiros avanços começaram a surgir por volta de 1847 quando Ignaz Semmelweis constatou a transmissão cruzada de microrganismos por meio das mãos e, então propôs uma das primeiras e mais importantes medidas de prevenção das IRAS, a lavagem das mãos. Décadas depois, em torno de 1865, as contribuições de Florence Nightingale proporcionaram avanços no controle da infecção e na epidemiologia hospitalar ao recomendar uma série de cuidados e estratégias relacionados ao paciente e ao meio com o objetivo de diminuir o risco de IH e ao implantar o primeiro sistema de vigilância de óbitos hospitalares (2,4,5).

No entanto, o grande marco no controle das infecções ocorreu na primeira metade do século XX, com a introdução dos antibióticos na prática clínica. A possibilidade de tratar infecções bacterianas foi um importante avanço na medicina, pois, propiciou a rápida redução das taxas de morbimortalidade associada a uma série de doenças até então consideradas fatais e oportunizou grandes saltos para o tratamento de doenças crônicas, posto que, com o uso dos antibióticos foi possível realizar procedimentos até então considerados improváveis devido ao elevado risco de infecção (6–9).

Os avanços científicos e tecnológicos na área da saúde ocorridos ao longo das últimas décadas têm permitido maior sobrevivência aos pacientes apoiada por tratamentos intensivos, uso de dispositivos invasivos, transplantes de órgãos e terapias medicamentosas potentes. No entanto, apesar dos benefícios, esses procedimentos colocam o paciente em condição de maior vulnerabilidade trazendo consequências como a ocorrência cada vez maior de infecções

adquiridas no ambiente hospitalar que associada ao aumento da resistência bacteriana às drogas colocam as IRAS em situação de difícil controle, apesar dos esforços para sua prevenção (10,11). Diante deste contexto, as IRAS são consideradas um grave problema de saúde pública, pois afetam grande número de pacientes em todo o mundo, elevando de forma significativa as taxas de mortalidade e aumentando diretamente os custos com a assistência à saúde, além de contribuir para a seleção e disseminação de microrganismos multirresistentes às drogas (do inglês, MDR – *multidrug resistant*) (12–14).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as IRAS são o evento adverso mais frequente na prestação de cuidados à saúde em todo o mundo (15) e, estima-se que aproximadamente 15% de todos os pacientes hospitalizados sofrem dessas infecções (14). No entanto, enquanto a prevalência das IRAS nos países desenvolvidos varia de 3,5% a 12,0% (15), com prevalência média de 7,1% nos países europeus (15,16) e de 3,2% a 4,0% nos Estados Unidos da América (EUA) (17,18), nos países de média e baixa renda a prevalência varia de 5,7% a 19,1%, com prevalência média em torno de 15,5% de acordo com estudos de alta qualidade desenvolvidos nessas regiões (13). A cada 100 pacientes hospitalizados, 7 em países desenvolvidos e 10 em países em desenvolvimento irão adquirir, pelo menos, uma infecção relacionada aos cuidados de saúde (15). Quanto ao Brasil, há poucos estudos de prevalência realizados em âmbito nacional e de acordo com estudo recente realizado por Fortaleza e colaboradores (2017), a taxa de IH no país é de 10,8% (19).

Quando se trata da proporção de pacientes que adquirem IH em unidade de terapia intensiva (UTI), os países com baixo poder econômico também apresentam os dados mais preocupantes, pois, enquanto na Europa aproximadamente 30% dos pacientes internados em UTIs são acometidos por pelo menos um episódio de IRAS, nos países de média e baixa renda essa proporção pode chegar até a 88,9%, estando geralmente associadas a altas taxas de mortalidade (15,20).

No que se refere aos fatores de risco, vale mencionar que são várias as condições que predis põem um paciente hospitalizado a adquirir infecção e estes podem ser classificados em intrínsecos, quando estão relacionados as características ou condições fisiológicas do indivíduo no momento da sua

admissão e, em extrínsecos, os quais abrangem todas as medidas terapêuticas instituídas ao paciente durante sua internação (21,22).

Dentre as características próprias dos pacientes pode-se mencionar o sexo, extremos de idade, doença de base (ex.: diabetes *mellitus*), múltiplas comorbidades, hospitalizações prévias, condição clínica no momento da admissão hospitalar. Quanto as medidas terapêuticas, destaca-se o tratamento ao qual o paciente será submetido (ex.: procedimentos invasivos e terapias medicamentosas), o setor de internação (UTI) e a internação prolongada. Quanto aos procedimentos invasivos, cabe destacar que falta de adesão aos cuidados assépticos, intercorrências pré, trans e pós-operatórias, esterilização inadequada de instrumentos cirúrgicos e materiais médico-hospitalares, condições inadequadas e múltiplas tentativas de inserção de cateteres, elevado tempo de permanência dos cateteres, más condições de higiene bucal, são alguns dos fatores de risco relacionados aos diferentes tipos de infecção (1,21–23).

Dentre os diferentes tipos de infecções adquiridas em ambiente hospitalar estão, principalmente, aquelas relacionadas aos procedimentos e dispositivos invasivos, dentre as quais destacam-se, as infecções do trato urinário associadas ao cateter vesical (ITU-AC), as infecções de corrente sanguínea relacionadas ao cateter (ICSRC), as infecções de sítio cirúrgico (ISC) e as pneumonias hospitalares, em especial as pneumonias associadas à ventilação mecânica invasiva (PAV). Essas infecções representam um dos eventos adversos mais comuns decorrentes da assistência, sendo responsáveis por elevadas taxas de mortalidade, prolongamento do tempo de hospitalização e aumento do custo da assistência, embora todos os principais tipos sejam passíveis de prevenção por meio de *bundles* de prevenção para cada uma delas (1,12,18,23).

De acordo com Iordanou e colaboradores (2017) as taxas gerais de infecções associadas a dispositivos invasivos giram em torno de 12,6%, sendo as ICSRC o tipo mais comum, representando 48,8% do total de infecções relacionadas aos dispositivos invasivos, seguida pela PAV (37,2%) e ITU-AC (14%) (10). Em outro estudo, realizado no Brasil, identificou-se maior prevalência de infecção em pacientes que faziam uso de cateter vascular (16,3%), cateter

vesical (14,7%) e que estavam sob ventilação mecânica (7,3%) e destacou-se ainda que 15,0% dos pacientes com infecção foram submetidos a intervenção cirúrgica no momento da admissão (19).

Considerando que as IRAS são uma causa significativa de adoecimento e morte, medidas com foco na prevenção são fundamentais, dentre elas ressaltase, a detecção e isolamento precoce de pacientes colonizados, aplicação de precauções padrão e de contato, adesão à higiene das mãos, implementação de pacotes de prevenção de IRAS e estabelecimento de programas de prevenção e controle dessas infecções (14,20). Além de medidas que promovam o uso racional de antimicrobianos (24,25).

## 1.2 Principais microrganismos causadores de infecção hospitalar

Muitos dos microrganismos causadores de infecção hospitalar fazem parte da microbiota do próprio paciente, que favorecidos pelo desequilíbrio da relação existente entre o microbioma humano e os mecanismos de defesa do hospedeiro, invadem e disseminam-se pelo organismo, levando a infecção localizada ou sistêmica. No entanto, um conjunto de espécies composto por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter species*, conhecidos pelo acrônimo ESKAPE, destacam-se dentre os principais agentes causadores dessas infecções (26,27). Mais recentemente, alguns autores vêm chamando atenção para a inclusão da *Escherichia coli* neste grupo, tendo em vista a relevância desta espécie nas infecções em ambiente hospitalar (28–30).

Dentre esse grupo de bactérias, *E. coli* é o agente prevalente em infecções comunitárias do trato urinário e, no hospital, é o principal componente aeróbico da microbiota mista identificado nas infecções intra-abdominais. *P. aeruginosa*, *Klebsiella* e *Enterobacter* são importantes causadores de pneumonia hospitalar, principalmente naqueles pacientes com tempo de internação prolongado e *A. baumannii* é um dos principais organismos responsáveis por surtos hospitalares em pacientes mais vulneráveis, especialmente aqueles internados em UTI. Os patógenos Gram-negativos são os causadores de aproximadamente metade de todas as bacteremias, a maioria

das quais ocorre devido ao excesso de bactérias presentes em outros locais de infecção primária (6,31,32).

#### 1.2.1 *Acinetobacter baumannii*: características do gênero e da espécie

Entre as bactérias atribuídas ao grupo ESKAPE, chama-se atenção para *A. baumannii*, espécie de maior importância clínica dentro do gênero *Acinetobacter* spp. (do grego, *akinetos*: não móveis). Essas bactérias são caracterizadas como cocobacilos Gram-negativos, estritamente aeróbios, não fermentadoras de glicose, não-fastidiosos, catalase-positivas e oxidase-negativas, pertencentes à família *Moraxellaceae*. São saprófitas de vida livre e estão amplamente distribuídos na natureza, uma vez que podem ser encontradas no solo, na água, no ar, em alimentos, em artrópodes, na microbiota de humanos e animais (33–36).

A ampla dispersão dessas bactérias se deve à sua versatilidade metabólica e nutricional, características como, utilização de várias fontes de carbono para crescimento, capacidade de crescer em diferentes condições de pH e temperatura, resistência a antibióticos e desinfetantes, tolerância a baixas umidades e capacidade de aderência e formação de biofilme contribuem para que esses organismos se adaptem a ambientes diversos (33–35).

*A. baumannii* é capaz de causar infecções graves em pacientes hospitalizados, incluindo infecções do trato respiratório inferior, principalmente em indivíduos sob ventilação mecânica, infecções de corrente sanguínea, do trato urinário e de feridas. Essas infecções são influenciadas por vários fatores, como aqueles relacionados a complexidade do ambiente hospitalar e dos setores de terapia intensiva, bem como, idade do paciente, comorbidades apresentadas, duração da internação, dias de ventilação mecânica, doenças intercorrentes e o uso de agentes antimicrobianos prévios, os quais favorecem a infecção (37,38). Ainda pode-se mencionar que, pacientes com bacteremia por *A. baumannii* MDR apresentam elevadas taxas de mortalidade e a exposição prévia aos carbapenêmicos e as penicilinas com inibidores de  $\beta$ -lactamases e a realização de outros procedimentos invasivos aumentam o risco de aquisição de

bacteremia por *A. baumannii* MDR. A idade avançada também é um dos fatores de risco para mortalidade relacionada à bacteremia por esta espécie MDR (39).

A elevada ocorrência de infecções nosocomiais causadas por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (do inglês, CRAB – *Carbapenem-Resistant A. baumannii*) pode estar relacionada a sua capacidade de causar surtos hospitalares, os quais são favorecidos pelos seus fatores de virulência e patogenicidade. Esses surtos de CRAB são principalmente ocasionados por três clones resistentes a múltiplas drogas e vem sendo relatados por estudos europeus desde a década de 1990 e, por isso foram originalmente denominados Clones Europeus (CE) (1, 2 e 3). No entanto, esses mesmos clones foram associados à infecção e disseminação de surtos em várias outras regiões do mundo, a exemplo dos EUA, Canadá, América do Sul, Europa, África, Oriente Médio, Sudeste Asiático, Austrália, entre outras e, então passaram a ser chamados de Clones Internacionais (CI) (1, 2 e 3) (40–42).

Apesar dos CI-1 e CI-2 serem os dois principais responsáveis pela maioria desses surtos (42) estudos vem reportando uma ampla distribuição geográfica de alguns outros clones (40) com destaque para duas linhagens atribuídas aos ST79<sup>PAS</sup> e ST25<sup>PAS</sup>, as quais correspondem aos CI-5 e CI-7, respectivamente (42,43).

### **1.3 Mecanismos de resistência associados aos $\beta$ -lactâmicos**

Os antibióticos são substâncias capazes de impedir ou inibir o crescimento de determinado microrganismo, são divididos em várias classes e, atualmente os mais utilizados são aqueles pertencentes a classe dos  $\beta$ -lactâmicos (44). Essas drogas são diversas em sua estrutura, porém possuem em comum o anel  $\beta$ -lactâmico de quatro membros que funciona como o farmacóforo ativo para esta classe. As penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactams são as subclasses que compõem o grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, nas quais estão distribuídos uma ampla variedade de antibióticos e associações entre antibióticos e inibidores de  $\beta$ -lactamases, constituindo-se a classe com o maior número de fármacos de importância crítica para a medicina humana (44).



Caracterizados como agentes de amplo espectro de atividade, são bem tolerados, apresentam baixa toxicidade e são bastante eficazes. Agem como substratos para as proteínas de ligação às penicilinas (do inglês, PBP – *Penicillin-binding Proteins*) interrompendo a formação da parede celular bacteriana, especificamente na manutenção do peptidoglicano, resultando em *lise* celular (44–47).

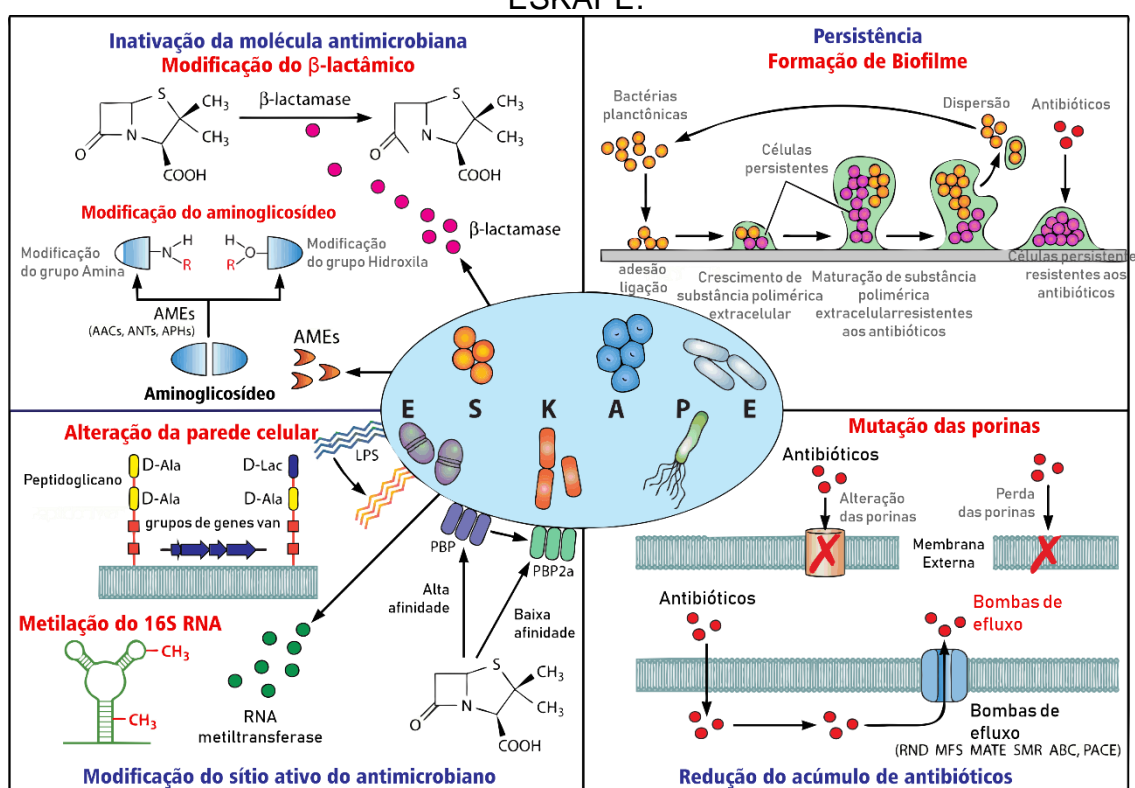
Os carbapenêmicos são um importante grupo dentro da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, pois, possuem uma ótima atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em comparação com os demais  $\beta$ -lactâmicos. Sua estrutura única, definida por um carbapenem acoplado a um anel  $\beta$ -lactâmico, confere proteção contra a maioria das  $\beta$ -lactamases, como as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (do inglês, ESBL – *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases*). Conseqüentemente, são considerados um dos medicamentos mais confiáveis para o tratamento de infecções bacterianas, tendo como principais representantes o imipenem, primeiro carbapenem a ser identificado em 1976, meropenem e ertapenem (44,48,49).

Diante de tais características os carbapenêmicos tiveram seu consumo aumentado, levando ao aumento da pressão seletiva o que vem contribuindo para a progressiva resistência a esses medicamentos tanto em bactérias Gram-negativas não fermentadoras (*P. aeruginosa* e *A. baumannii*), bem como, *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella spp*, *E. coli* e *Enterobacter spp*) e bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus spp* e *Enterococcus spp*), as quais são ou vem se tornando resistentes a maioria dos carbapenêmicos disponível para uso clínico (50).

Quanto a resistência bacteriana às drogas, cabe destacar que esta pode ser natural ou intrínseca, quando está relacionada com as propriedades inerentes das bactérias, as quais não permitem que o antibiótico atue ou, adquirida, quando a bactéria apresenta resistência a um antibiótico ao qual era previamente sensível. A resistência adquirida pode ser determinada por mutações nos próprios genes da bactéria ou pela aquisição de genes de resistência (51), esses últimos são normalmente mobilizados por elementos genéticos móveis (EGM), a exemplo dos transposons e plasmídeos (52).

Os mecanismos pelos quais as bactérias desenvolvem resistência aos antibióticos são os mais diversos, sendo que um mesmo organismo pode apresentar um mecanismo apenas ou conter vários mecanismos de resistência concomitantes. Esses mecanismos podem ser amplamente classificados em quatro grupos: (i) inativação ou alteração da molécula antimicrobiana; (ii) modificações no sítio alvo do antibiótico; (iii) redução da penetração e do acúmulo de antibióticos e; (iv) outros mecanismos e estratégias de sobrevivência (figura 1) (9,53).

Figura 1 - Mecanismos de resistência aos antibióticos em bactérias do grupo ESKAPE.



Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2020) (53).

*A. baumannii* é um exemplo de microrganismo que além de possuir resistência intrínseca a uma ampla variedade de antimicrobianos, demonstra um grande potencial para a aquisição de novos determinantes de resistência, respondendo rapidamente à pressão seletiva do meio ambiente. Conferindo a essa espécie perfis extensivamente resistente às drogas, os quais são mediados por uma diversidade de mecanismos de resistência (32,34,53–57). No entanto, para fins desta revisão, serão abordados os principais mecanismos

apresentados por este patógeno que conferem resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, descritos a seguir.

### 1.3.1 $\beta$ -lactamases

Os genes que codificam as  $\beta$ -lactamases são denominados *bla*, seguidos pelo nome da enzima específica (p. ex.: *bla<sub>KPC</sub>*), podendo ser encontrados no cromossomo bacteriano ou localizados em EGMs como parte do genoma acessório. Em termos de expressão, a transcrição desses genes pode ser constitutiva (continuamente ativada) ou exigir um sinal externo para induzir sua produção (presença do  $\beta$ -lactâmico). Dentro do grupo das  $\beta$ -lactamases, cabe destacar as carbapenemases, enzimas específicas com capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos (9,50,58).

A classificação das  $\beta$ -lactamases é tradicionalmente baseada em dois esquemas principais, um que classifica essas enzimas de acordo com sua estrutura primária (59) e outro que as classifica com base em suas características funcionais (60).

A classificação proposta por Ambler em 1980 utilizou a homologia da sequência de nucleotídeos e aminoácidos das enzimas para agrupar as  $\beta$ -lactamases em quatro classes (A, B, C e D), de acordo com as diferenças em seus mecanismos catalíticos, estas classes ainda foram divididas em dois grupos: serina- $\beta$ -lactamases (classe A, C e D) e metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ L) (Classe B) (59–61). As  $\beta$ -lactamases de classe B utilizam zinco ( $Zn^{2+}$ ) para inativar os  $\beta$ -lactâmicos, e todas são carbapenemases, já as  $\beta$ -lactamases das classes A, C e D usam uma serina como nucleófilo para hidrolisar a ligação  $\beta$ -lactâmica (50,62).

A classificação das  $\beta$ -lactamases proposta por Bush em 1989 e atualizada por Bush, Jacoby e Medeiros em 1995 divide essas enzimas em quatro grupos funcionais e subgrupos, relacionando características bioquímicas, principalmente com base na especificidade do substrato e características enzimáticas. Essa classificação foi novamente revisada por Bush e Jacoby em 2010, quando foram considerados três grupos e seus respectivos subgrupos, com base em seus perfis de hidrólise e inibição, sendo esta última a mais

utilizada, mas com uma correlação entre as duas classificações anteriores e com a classificação de Ambler (50,60,63). A comparação entre os dois esquemas principais de classificação dessas enzimas é apresentada na tabela 1.

Tabela 1 - Comparação entre dois os dois esquemas de classificação das  $\beta$ -lactamases Ambler (1980) e Bush; Jacoby; Medeiros (1995).

Classes de Ambler: sítio catalítico (espectro)	Grupos de Bush; Jacoby; Medeiros: sítio catalítico (espectro)	Substratos	Inibido por	Exemplos
A: serina (variável)	2a: serina (penicilinas)	Penicilinas	Clavulanato, avibactam e outros inibidores mais recentes	Penicilinas de bactérias Gram-positivas
	2b: serina (penicilinas)	Penicilinas e cefalosporinas de espectro estreito	Clavulanato, avibactam e outros inibidores mais recentes	TEM-1, TEM-2 e SHV-1
	2be: serina (ESBLs)	Penicilinas e cefalosporinas, incluindo as de espectro estendido	Clavulanato, avibactam e outros inibidores mais recentes	SHV-2, TEM-10, CTX-M e GES-1
	2br: serina (resistentes a inibidores)	Penicilinas	Avibactam e outros inibidores mais recentes	TEM-30 e SHV-72
	2c: serina (penicilinas)	Penicilinas e carbenicilina	Clavulanato, avibactam e outros inibidores mais recentes	PSE (CARB)
	2f: serina (carbapenemases)	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenens	Avibactam e outros inibidores mais recentes	KPC, SME, NMC-A e GES-2
B: metalo (carbapenemase)	3: metalo (carbapenemases)	Maioria dos $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenens, mas não monobactams	Agentes quelantes (EDTA) e ANT431	IMP, VIM e NDM
C: serina (cefalosporinase)	1: serina (cefalosporinas)	Penicilinas e cefalosporinas	Cloxacilina, avibactam e outros inibidores mais recentes	AmpC cromossômica, CMY, ACT-1 e DHA
D: serina (oxacilinas)	2d: serina (oxacilinas)	Penicilinas e cloxacilina; algumas incluem cefalosporinas e/ou carbapenens	Cloreto de sódio; algumas por clavulanato, avibactam e outros inibidores mais recentes	OXA-1/30, OXA-10, OXA-23 e OXA-48

Fonte: Modificado de Bush; Bradford (2019) (64).

É importante destacar que essas classificações têm advertências e não se sobrepõem completamente, decifrar o papel dos diferentes tipos de enzimas e suas características é uma tarefa complexa (9). Neste estudo será utilizado a classificação proposta por Ambler (1980) como base para revisão, com ênfase nas carbapenemases.

### 1.3.1.1 $\beta$ -lactamases de classe A

Essas enzimas são caracterizadas por serem inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Essa classe inclui uma ampla variedade de enzimas com atividades muito distintas, abrangendo desde penicilinas, TEM-1 (Temoneira- $\beta$ -lactamase) e SHV-1 (do inglês, *Sulphydryl variable*  $\beta$ -lactamase) a carbapenemases (KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) passando por ESBLs, CTX-M (do inglês – *cefotaxime hydrolyzing capabilities*  $\beta$ -lactamases), sendo essas duas últimas enzimas (KPC e CTX-M) as representantes da classe A com importante impacto na clínica. Quanto as

carbapenemases que pertencem a esta classe, até o momento, foram descritas cinco famílias diferentes das quais três são habitualmente codificadas por cromossomos, IMI (enzima hidrolizante imipenem), SME (enzima *Serratia marcescens*) e NMC (non-metalloenzimatic carbapenemase) e duas, KPC e GES (do inglês, *Guiana Extended Spectrum*), são classicamente codificadas em plasmídeos ou outros EGMs (9,32).

O primeiro relato da enzima KPC ocorreu em 1996 a partir de um isolado de *K. pneumoniae* recuperado de um paciente na Carolina do Norte, EUA (65). Embora sejam encontradas principalmente em *Klebsiella spp.*, há relatos dessa enzima em vários outros patógenos Gram-negativos, dentre eles, *Enterobacter spp.*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella spp.*, bem como em organismos não fermentadores, como *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. O primeiro caso de KPC em *Acinetobacter spp.* foi registrado em Porto Rico em 2010, na ocasião foi descrito uma nova variante desta enzima, a KPC-10 (66). Um total de 22 variantes do gene *bla<sub>KPC</sub>* foi descrito até o momento, a maioria localizados em plasmídeos contendo elementos transponíveis ou em associação com sequências de inserção (do inglês, IS – *insertion sequence*) (9). A enzima GES é originária de um isolado clínico de *K. pneumoniae* proveniente da Guiana Francesa que apresentava resistência de espectro estendido aos  $\beta$ -lactâmicos (67). O primeiro relato desta enzima em *A. baumannii* ocorreu na França e foi caracterizada como GES-11. Esta enzima confere resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo o aztreonam, possui uma característica própria, em que substituições de aminoácidos em seu sítio ativo podem ampliar sua atividade hidrolítica, reduzindo a suscetibilidade antimicrobiana aos carbapenêmicos (68).

Dentre as  $\beta$ -lactamases de classe A inclui-se ainda as ESBLs, enzimas de grande importância clínica, por ser um mecanismo de resistência, principalmente, mediado por plasmídeos (34,45).

#### 1.3.1.2 $\beta$ -lactamases de classe B

As M $\beta$ L são enzimas da classe B, caracterizadas por apresentarem um íon metálico no seu sítio ativo, geralmente o Zn<sup>2+</sup>. Essas enzimas são todas carbapenemases e atribuem resistência a um amplo espectro de  $\beta$ -lactâmicos,

além dos carbapenêmicos. São inibidas por agentes quelantes como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ou o ácido 2-mercaptopropiônico, mas não são afetadas pelos inibidores convencionais de  $\beta$ -lactamases, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (32,69,70). E, embora hidrolisem eficientemente as cefamicinas, o aztreonam é tipicamente um substrato pobre. Essas enzimas foram descobertas há mais de 50 anos, codificadas por genes geralmente localizados no cromossomo de bactérias não patogênicas, no entanto, durante a década de 1990, enzimas como IMP (imipenemase) e VIM (Verona imipenemase) passaram a ser frequentemente relatadas em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. Ademais, observou-se que genes que codificam essas enzimas foram encontrados como parte do genoma acessório dessas bactérias sugerindo transmissão horizontal de genes de resistência (9,32).

Dentre as metalo-carbapenemases há quatro famílias que apresentam relevância clínica, por estarem disseminadas em vários países e em cepas de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *Enterobacteriaceae*, são elas, IMP, VIM, SPM (São Paulo metalo- $\beta$ -lactamase) e NDM (New Delhi metalo- $\beta$ -lactamase) (9,69).

As enzimas IMP foram descritas no Japão no início dos anos 1990 em isolado de *S. marcescens* que apresentava resistência ao imipenem e as cefalosporinas, desde então, mais de 20 subtipos diferentes foram descritos, sendo encontradas, principalmente em *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., os genes *bla*<sub>IMP</sub> foram encontrados em plasmídeos e fazem parte dos integrons de classe 1. As enzimas da família VIM foram descritas pela primeira vez no final dos anos 1990 em Verona, Itália e, desde então, se espalharam pelo mundo. Inicialmente encontradas em *P. aeruginosa*, mas sua associação com integrons de classe 1, juntamente com relatos de localização em diferentes tipos de EGMs parece ser a provável causa de sua disseminação para muitas outras espécies bacterianas. Entre as diferentes variantes da enzima VIM descritas até o momento, a VIM-2 é a mais amplamente distribuída, sendo encontrada na Europa, Ásia, África e Américas (9,49,71).

Em 2008, uma nova carbapenemase foi identificada em um isolado de *K. pneumoniae* recuperado de um paciente sueco com internação prévia em um hospital de Nova Delhi, Índia. A enzima foi designada NDM-1 e compartilha

pouca identidade de aminoácidos com outros membros das enzimas da classe B de Ambler, mas seu perfil hidrolítico é muito semelhante a todos eles. O gene *bla<sub>NDM</sub>* foi encontrado em diversos tipos de plasmídeos em várias espécies de bactérias Gram-negativas, bem como, associado sequências de inserção do tipo IS*Aba*125 (IS*Aba* – Sequência de inserção de *A. baumannii*). Ademais, observou-se que genes codificadores das enzimas NDM geralmente carregam vários outros determinantes de resistência, sendo assim, a presença de NDM-1 é comumente acompanhada por um fenótipo de multirresistência às drogas (9).

Quanto a enzima SPM, esta foi identificada em um isolado de *P. aeruginosa* proveniente de um paciente internado em um hospital de São Paulo em 2001 (72). Essa MβL foi denominada de SPM-1 e hidrolisa todos os antimicrobianos β-lactâmicos, preferencialmente carbapenêmicos, sendo incapaz de hidrolisar aztreonam, ticarcilina e ácido clavulânico. E embora já se tenha evidenciado a disseminação de *P. aeruginosa* produtora SPM-1 em vários estados brasileiros, essa enzima parece estar restrita ao Brasil (61).

A resistência aos carbapenêmicos devido à produção de MβL em *Acinetobacter* spp., tem sido raramente relatada no Brasil, sendo o primeiro isolado clínico de *A. baumannii* produtor de MβL do tipo IMP-1 identificado na UTI de um hospital de São Paulo (73). Dentre os relatos posteriores, pode-se mencionar a detecção da enzima IMP em *Acinetobacter* spp. isolados recuperados de hospitais de São Paulo (74,75) e a detecção de isolados produtores de NDM-1 pertencente a diferentes espécies de *Acinetobacter* nas regiões sul e norte do país (76–79).

#### 1.3.1.3 β-lactamases de classe D

As enzimas da classe D, também conhecidas como oxacilinases (OXA), constituem um grupo heterogêneo de β-lactamases com significativa atividade da carbapenemase. Esse grupo de enzimas foi inicialmente diferenciado das penicilinases da classe A devido à sua capacidade de hidrolisar oxacilina, o que justifica o seu nome (9,32,80,81).

As enzimas do tipo OXA estavam entre as primeiras β-lactamases detectadas, no entanto, eram relativamente raras. A partir dos anos 1980, foram

identificados os primeiros isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos produtores de OXA- $\beta$ -lactamases codificadas em plasmídeo e, verificou-se, ainda que todas as linhagens de *A. baumannii* possuíam uma OXA- $\beta$ -lactamase cromossômica. Em decorrência da capacidade de alguns membros da família OXA em hidrolisar carbapenêmicos, essas enzimas tornaram-se mais importantes, particularmente em *A. baumannii*, transformando essas  $\beta$ -lactamases de pequena relevância em um grande problema que compromete a eficácia clínica desses fármacos (64,82).

Dentre as quatro classes moleculares das  $\beta$ -lactamases, as enzimas de classe D são as mais diversas, com enzimas que apresentam espectro estreito e estendido de hidrólise, com capacidade de degradar cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos (9,80). As OXA são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, no entanto, algumas são inibidas pelo tazobactam e avibactam (64), enquanto, *in vitro*, suas atividades podem ser inibidas pelo cloreto de sódio (NaCl). Esta propriedade não é compartilhada pelas  $\beta$ -lactamases de outras classes, definindo uma característica útil para identificação *in vitro* dessas enzimas (80). Atualmente, as enzimas OXA com atividade de hidrólise de carbapenêmicos incluem, principalmente, os seguintes grupos: OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-48-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-143-like e OXA-235-like (42,82–84).

O primeiro grupo de CHDL (do inglês, *Carbapenem-hydrolyzing class D*  $\beta$ -lactamase) identificado em *A. baumannii* foi o grupo OXA-23, caracterizado como o mais difundido nesta espécie e reportado em todo o mundo, sendo primeiramente isolado em Edimburgo, Escócia em 1985 no mesmo ano em que o imipenem foi aprovado para uso clínico (49,82,85). Os genes que codificam esse grupo de enzimas são frequentemente localizados em plasmídeos e encontrados em muitas espécies de *Acinetobacter*, além de espécies pertencentes às *Enterobacteriaceae*. Essas enzimas são capazes de hidrolisar oximinocefalosporinas, aminopenicilinas, piperacilina, oxacilina e aztreonam, além dos carbapenêmicos e atualmente contribuem para a resistência global de *A. baumannii* a esses fármacos. Dentre as enzimas que compõem este grupo estão OXA-27 e OXA-49 (34,82). Os genes *bla*<sub>OXA-23</sub> estão geralmente localizados em plasmídeos e são flanqueados por duas cópias das sequências



de inserção IS*Aba*1 em direções opostas nos transposons transmissíveis Tn2006 e Tn2008. Eles também podem existir em associação com o transposon Tn2007, que não possui a segunda cópia da IS*Aba*1, e está associado a uma cópia do IS*Aba*4. É provável que as sequências de inserção atuem como fortes promotores para a expressão de OXA-23, o que aumenta a resistência aos carbapenêmicos. Além da localização nos plasmídeos, evidências mostram inserções cromossômicas de *bla*<sub>OXA-23</sub> associadas à transmissão mediada por transposon (84).

O grupo de enzimas OXA-24/40 foi o segundo a ser identificado em *A. baumannii*. A primeira enzima deste grupo, OXA-24, posteriormente denominada OXA-40 foi descrita em isolados provenientes de um surto na Espanha, em 1997. A partir de então, outras variantes enzimáticas foram descobertas (OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207). Embora, inicialmente encontradas em isolados de *A. baumannii* e, principalmente em cromossomos, sem associação com elementos genéticos móveis, estudos identificaram genes semelhantes ao *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub> em plasmídeos de outras espécies de *Acinetobacter*, em *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Em geral, esse grupo de enzimas é capaz de hidrolisar as penicilinas, mas parecem mostrar fraca atividade contra as cefalosporinas e os carbapenêmicos. Das três enzimas (OXA-25, OXA-26 e OXA-40), a OXA-40 demonstrou a maior atividade contra os carbapenêmicos e assim como para OXA-23, diversos mecanismos de resistência atuam em conjunto com OXA-40 para conferir elevados níveis de resistência a esta classe de fármacos (34,82,84,85).

O maior grupo de OXA- $\beta$ -lactamases identificado é do tipo OXA-51, a primeira enzima do grupo foi identificada em isolados de *A. baumannii* na Argentina entre 1993 e 1994 (86) e são intrínsecas à espécie. Até o momento 95 variantes enzimáticas foram identificadas e o grande número de variantes, por si só, é uma indicação de que essas enzimas cromossomicamente codificadas estão sob considerável pressão seletiva do uso de antibióticos. As enzimas desse grupo são uma preocupação, pois, sendo intrínseca à espécie, supõe-se que todos os isolados de *A. baumannii* são capazes de se tornar resistente aos carbapenêmicos. A análise sequencial do *bla*<sub>OXA-51</sub> fornece evidências que

regiões desses genes são preferencialmente alteradas sob a pressão seletiva do uso de antibióticos (82).

A primeira enzima do grupo OXA-58 foi identificada na França em 2003, sendo isolada em uma cepa clínica de *A. baumannii* MDR que também apresentava resistência aos carbapenêmicos. As propriedades dessas enzimas são semelhantes as outras enzimas do tipo OXA em *A. baumannii* com atividade fraca contra carbapenêmicos e penicilinas e uma habilidade para hidrolisar cefpirome e cefalotina, mas não ceftazidima, cefotaxima e cefepima. No entanto, estudos apontam que essa enzima requer múltiplos mecanismos de resistência que atuam em conjunto, a exemplo das bombas de efluxo. Devido aos muitos mecanismos de resistência de *A. baumannii*, isolados desta espécie que carregam genes do tipo *bla*<sub>OXA-58</sub> são frequentemente identificados com altos níveis de resistência aos carbapenêmicos. Três variantes da enzima foram identificadas, OXA-96, OXA-97 e OXA-164 (82,85).

A enzima OXA-143 é a primeira enzima representante de um novo subgrupo de  $\beta$ -lactamases de classe D que hidrolisam carbapenêmicos. Descoberta em 2004, provenientes de três cepas clínicas de *A. baumannii* resistentes a quase todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, as quais foram isoladas de pacientes internados em uma UTI no Brasil. Essas enzimas hidrolisam penicilinas, oxacilina, meropenem e imipenem, mas não cefalosporinas de espectro estendido. Como as outras carbapenemases do tipo OXA adquiridas, esse grupo de enzimas é capaz de conferir altos níveis de resistência aos carbapenêmicos quando expresso em isolados que apresentam outros mecanismos de resistência. Outras variantes do grupo OXA-143 foram identificadas e incluem OXA-182, OXA-231, OXA-253 e OXA-255. Embora o Brasil pareça ser o país com o maior número de relatos de OXA-143, esta enzima também foi identificada em isolados de *A. baumannii* provenientes de hospitais iranianos e em plasmídeos de cepas de *A. baumannii* e *A. pittii* no Brasil e na Coreia do Sul (82,84,87–89).

Em 2013, mais três novas oxacilinases foram identificadas em isolados de *A. baumannii* nos Estados Unidos e México, OXA-235 e suas variantes OXA-236 e OXA-237. A expressão de OXA-235 resultou em susceptibilidade reduzida aos carbapenêmicos, porém a concentração inibitória mínima (CIM) das

cefalosporinas não foi alterada. Os genes que codificam essas novas enzimas foram encontrados entre duas sequências de inserção do tipo ISAb<sub>a</sub>1. Recentemente, estudos reportam a presença de OXA-235 em isolados de *A. baumannii* em hospitais do Canadá e a variante OXA-278 foi detectada cepas de *Acinetobacter iwoffii* em estações de tratamento de água em Cingapura (84,90).

A enzima OXA-48 é uma CHDL amplamente disseminada que foi originalmente descrita em 2001 em Istambul na Turquia a partir de um isolado de *K. pneumoniae* MDR, com resistência ao carbapenem. A OXA-48 e suas variantes estão agora amplamente disseminadas em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, outras *Enterobacteriaceae* e *A. baumannii* (9,64). Essa enzima tem um baixo nível de atividade hidrolítica contra os carbapenêmicos, com maior atividade contra imipenem do que contra meropenem. Desde 2001, muitas variantes nomeadas de OXA-48 foram identificadas, sendo que, OXA-162, OXA-163, OXA-181 e OXA-232 tiveram suas propriedades analisadas e, enquanto OXA-163 apresenta um fraco perfil de hidrólise contra os carbapenêmicos ela tem a capacidade de hidrolisar ceftazidima, aztreonam, o que não é visto na OXA-48, e uma capacidade aumentada de hidrolisar cefotaxima e cefepima em comparação a OXA-48, tornando-a semelhante a uma ESBL, já OXA-181 e OXA-232 parecem semelhantes a OXA-48 em sua atividade e OXA-232 demonstra hidrólise contra as penicilinas. Cepas produtoras de OXA-48 com valores aumentados da CIM para os carbapenêmicos geralmente possuem um mecanismo de resistência não enzimático secundário (64,82).

Em síntese, as enzimas do tipo OXA possuem uma ampla variedade de perfis hidrolíticos, com enzimas codificadas por genes localizados no cromossomo bacteriano, mas em sua maioria, esses genes estão relacionados a EGMs. Embora as CHDL sejam particularmente prevalentes em *A. baumannii*, já foram relatadas em outros organismos clinicamente relevantes, como *P. aeruginosa* e várias espécies de *Enterobacteriaceae*. Além disso, a transmissão intra e interespecie desses genes tem sido bem-sucedida, principalmente para as enzimas OXA-23 e OXA-58 que atualmente apresentam distribuição mundial, sendo observada uma crescente disseminação de *A. baumannii* produtora de OXA-23, em especial entre pacientes hospitalizados em UTIs (9,81).

### 1.3.2 Outros mecanismos de resistência em *A. baumannii*

Apesar da produção de  $\beta$ -lactamases do tipo carbapenemases ser o principal mecanismo pelos quais as bactérias adquirem resistência aos carbapenêmicos e, por isso ele vem sendo investigado com mais detalhes, cabe destacar que alguns fenótipos de panresistência às drogas presentes em bactérias intra-hospitalares normalmente são o resultado da associação de diferentes mecanismos de resistência em um mesmo isolado. Essa combinação leva a elevados níveis de resistência aos carbapenêmicos, principalmente em bactérias Gram-negativas, dentre elas *A. baumannii* (50).

#### 1.3.2.1 Alteração das proteínas de ligação às penicilinas

A maioria dos antibióticos liga-se especificamente a um ou mais alvos na célula bacteriana, para evitar os efeitos desses fármacos as bactérias utilizam como estratégia a alteração no sítio ativo do antibiótico, interferindo no seu local de destino, por meio da proteção ou da modificação desse alvo. Esse mecanismo impede sua ligação ou diminui a afinidade dessa interação, desse modo o antibiótico não reconhece o alvo na célula bacteriana tornando-se ineficaz (9,53,91).

Geralmente, essas alterações têm origem em mutações em genes da própria bactéria, como consequência impedem a ligação dos antimicrobianos, mas não interferem na função do alvo alterado. Assim, a bactéria mantém suas funções, mas escapa da ação dos antibióticos. Um exemplo é a mutação do gene que codifica as PBPs, essas proteínas são os alvos dos  $\beta$ -lactâmicos e a inibição dessas proteínas produz um desequilíbrio na síntese da parede celular, resultando na diminuição do crescimento ou *lise* celular, por atuarem no processo de biossíntese da parede celular bacteriana (91). Esse mecanismo é um dos mais comuns e afeta quase todas as classes de antimicrobianos, no entanto, a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em decorrência da alteração de PBPs é mais comum em bactérias Gram-positivas em relação às Gram-negativas (9,56).

### 1.3.2.2 Alteração na permeabilidade da membrana externa

As bactérias Gram-negativas apresentam em torno de seu peptidoglicano uma membrana externa, que atua como primeira linha de defesa contra a penetração de compostos tóxicos, incluindo os antibióticos e ao mesmo tempo permite o influxo de nutrientes e extrusão de produtos não utilizados pela célula (9). Muitos dos antibióticos usados na prática clínica têm seus alvos intracelulares ou, no caso de bactérias Gram-negativas, localizados na membrana interna. Portanto, o composto deve penetrar nesta membrana para exercer seu efeito antimicrobiano e para isso costumam usar proteínas transmembranas (do inglês, OMP – *Outer membrane proteins*) denominadas porinas, as quais são capazes de formar canais hidrofílicos que permitem o transporte de moléculas através de membranas de bicamada lipídica. Para evadir-se do efeito desses fármacos, as bactérias desenvolveram mecanismos para impedir que o antibiótico atinja seu alvo intracelular, diminuindo a captação da molécula antimicrobiana, por meio da alteração da permeabilidade da membrana (9,49,56).

Mutações que levam a diminuição da permeabilidade da membrana externa através da produção de porinas modificadas, perda da expressão da porina ou alteração nos tipos de porinas é um mecanismo particularmente importante nas bactérias Gram-negativas. Moléculas hidrofílicas como  $\beta$ -lactâmicos (incluindo os carbapenêmicos), tetraciclinas e algumas fluoroquinolonas que dependem de porinas para penetrar a barreira da membrana externa, são particularmente afetadas por esse mecanismo. Além disso, essas mutações podem surgir durante o tratamento e, principalmente, aumentar a influência de outros mecanismos de resistência, como bombas de efluxo (9,49,53,56).

A resistência geral das espécies de *Acinetobacter* aos antibióticos decorre, em parte, do número e tamanho reduzidos de porinas em sua membrana externa o que confere a estes organismos uma baixa permeabilidade aos antibióticos, na verdade muito menor quando comparadas a outras bactérias Gram-negativas (92). E a resistência de bactérias Gram-negativas, dentre elas, *A. baumannii* aos carbapenêmicos está associada a perda ou inativação de uma

porina (CarO), a qual permite que esse patógeno se torne resistente ao imipenem (53,91).

### 1.3.2.3 Hiperexpressão de bombas de efluxo

As bombas de efluxo são máquinas bacterianas complexas capazes de expulsar um composto tóxico da célula, dentre eles, os antibióticos (9) e dessa forma as concentrações do fármaco nunca atingem seus níveis adequados para provocar um efeito antibacteriano (91).

A maioria das bombas de efluxo são transportadores multidrogas que bombeiam eficientemente uma ampla gama de antibióticos e contribuem significativamente para o aumento da resistência a múltiplos fármacos (48,91). Uma variedade de sistemas de efluxo são encontradas nas bactérias, sendo que uma única cepa pode possuir vários transportadores de efluxo de famílias diferentes, com os espectros de substratos sobrepostos (48).

Esses sistemas podem ser específicos ao substrato, como por exemplo para um antibiótico em particular ou podem apresentar uma ampla especificidade de substrato, este último geralmente encontrada nas bactérias MDR. Este mecanismo afeta uma ampla gama de classes de antibióticos, dentre eles fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos e polimixinas. Os genes que codificam as bombas podem estar localizados em EGMs ou no cromossomo bacteriano, este último pode explicar a resistência intrínseca de algumas espécies a um determinado antibiótico (9).

O tipo mais comum de bomba de efluxo nas bactérias Gram-negativas é a bomba polisseletiva, pertencente a superfamília RND (do inglês, *Resistance-nodulation-division*), que desempenha um papel fundamental no fenótipo MDR desses organismos. Esse tipo de bomba expelle uma variedade de antibióticos e moléculas estruturalmente não relacionadas, como corantes e sais biliares, mas também detergentes e biocidas que são frequentemente usados na prática médica (91).

Os isolados de *A. baumannii*, também podem demonstrar um fenótipo MDR através da presença e superexpressão da bomba de efluxo, sendo o sistema de efluxo AdeABC o primeiro a ser descrito nesta espécie, pertencente

à família RND, esta bomba está associada à resistência a uma ampla gama de antibióticos, incluindo fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclinas, tigeciclina, macrolídeos, lincosamidas, cloranfenicol e aminoglicosídeos (91,93).

#### **1.4 Transferência horizontal de genes de resistência aos antibióticos**

Por meio da transferência horizontal de gene ou processo de troca de material genético as bactérias adquirem elementos extracromossômicos ou DNA (do inglês – *Deoxyribonucleic acid*) exógeno os quais codificam funções que oferecem vantagens seletivas para esses microrganismos, dentre elas a resistência aos antibióticos (94,95). Essa dispersão de elementos genéticos pode ocorrer entre os procaríotos por meio de transdução (bacteriófagos), transformação (ambiente) e conjugação (plasmídeos) (51,96).

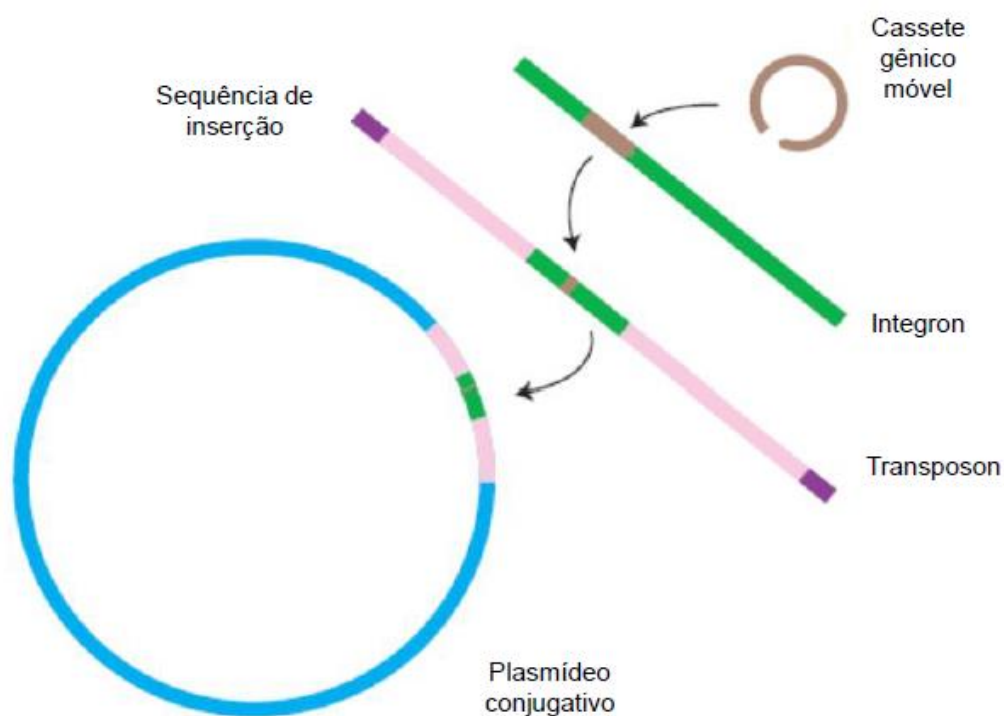
A transdução é o mecanismo de transporte de DNA por meio de bacteriófagos, vírus de DNA ou RNA (do inglês – *Ribonucleic acid*) que infectam somente organismos procaríotos. Para que isso ocorra, um fago se replica dentro do organismo doador e, no processo de empacotamento do DNA, incorpora ocasionalmente fragmentos de DNA do hospedeiro no capsídeo do fago. Os fagos são então liberados no ambiente e podem injetar seu DNA em um novo hospedeiro. Já a transformação é a captação de DNA de células vizinhas presentes no ambiente, esse mecanismo depende da presença de um plasmídeo ou de fragmentos de DNA cromossômico que são frequentemente liberados como resultado de morte celular ou excreção ativa. Para isso, é necessário apenas um receptor viável e, geralmente, um mecanismo para a captação ativa de DNA extracelular (96).

Muitos elementos genéticos podem, ainda, ser transferidos por conjugação, processo complexo, de várias etapas, mediado por plasmídeos (96). Muitos dos genes de resistência encontrados em plasmídeos ou no cromossomo são frequentemente carregados por integrons integrados a transposons, que atuam como reservatórios e sistema de mobilização de genes (94).

A figura 2 demonstra a composição de um EGM, na qual os cassetes gênicos são inseridos em integrons, os quais podem ser inseridos em transposons compostos, flanqueados por sequências de inserção, e esses por

sua vez, podem ser inseridos em um elemento móvel como um plasmídeo conjugativo. Sendo assim, o plasmídeo passa a ser um meio comum para o transporte de informação genética (96). Esses elementos serão descritos a seguir.

Figura 2 - Representação de um elemento genético móvel



Fonte: Adaptado de Normann, Hansen, Sørensen (2009) (96).

Os transposons são elementos genéticos com habilidade de se mover dentro do genoma bacteriano, sendo capazes de se translocar de um local do genoma para outro, de genoma para plasmídeo e vice-versa, por um mecanismo denominado transposição (94,97). Essas transposições são consideradas uma das principais causas de rearranjos do DNA bacteriano, que por sua vez podem causar alterações na expressão gênica (97).

Em *A. baumannii*, os transposons Tn2006, Tn2007 e Tn2008 estão associados ao gene *bla<sub>OXA-23</sub>*. No Tn2006, *bla<sub>OXA-23</sub>* é flanqueado por duas cópias da *ISAba1*, localizada em direções opostas, o Tn2008 é semelhante ao Tn2006, mas não possui a segunda cópia da *ISAba1* e no Tn2007, o gene *bla<sub>OXA-23</sub>* está associado a uma cópia da *ISAba4* localizada nesse gene (97).



Desde sua identificação IS*Aba1* tem sido associada com genes que codificam uma série de  $\beta$ -lactamases do tipo OXA incluindo tanto enzimas intrínsecas quanto adquiridas a exemplo dos genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> e *bla*<sub>OXA-235-like</sub> (82,83,98). Esses elementos fornecem duas principais funções, i) codificam uma transposase e, portanto, são móveis e, ii) podem conter regiões promotoras que ativam a expressão ou super expressão de genes de resistência (34). No entanto, sugere-se que a super expressão das CHDLs também pode estar associada a presença de IS*Aba1* que flanqueia esses genes e, portanto, pode resultar em diminuição da suscetibilidade aos carbapenêmicos (83). A sequência de inserção IS*Aba3* é comumente associada a genes do tipo *bla*<sub>OXA-58</sub>, geralmente com uma cópia *upstream* e uma cópia *downstream* do gene codificador dessa  $\beta$ -lactamase, formando um transposon composto (82,97).

Cassetes gênicos são pequenos elementos móveis (0,5 a 1kb) que, habitualmente, consiste em um único gene, normalmente sem promotor e com um local de recombinação *attC*. Podem existir em forma livre circular, não são replicativos e geralmente são encontrados inseridos em um integron (52,99). O integron, por sua vez, é descrito como uma estrutura genética versátil capaz de capturar genes de resistência a antibióticos e de promover sua transcrição e expressão (83). Embora não apresentem autonomia de movimentação, estão frequentemente associados a elementos genéticos móveis, como transposons e plasmídeos, mas também podem estar localizados no cromossomo de muitas espécies bacterianas (94,99). Dessa forma são considerados uma importante classe de elementos genéticos, desempenhando um papel relevante na disseminação de genes de resistência a diversas classes de antibióticos, principalmente em bactérias Gram-negativas, a exemplo de *A. baumannii* espécie na qual considera-se que a ocorrência de integron possa sugerir seu alto potencial endêmico (83,99).

Um integron é geralmente caracterizado pela presença de um gene *intI*, um local de recombinação *attI* e um promotor (Pc). A recombinação catalisada pela *intI* entre os locais *attI* do integron e a região *attC* do cassete insere o cassete no integron na orientação que permite a expressão do gene transportado pelo cassete a partir do promotor Pc. Vários cassetes gênicos podem ser

inseridos no mesmo integron, resultando em um perfil bacteriano de multirresistência às drogas (52).

Até o momento mais de cinco classes de integron têm sido descritas e a base para essa classificação é a sequência de aminoácidos das integrases. Os integrons de classe 1, 2 e 3 foram identificados pela primeira vez em associação com elementos genéticos móveis e são as classes mais comumente encontradas, enquanto os integrons de classe 4 e 5 parecem ser raros e não foram, até o momento, identificados em espécies de interesse clínico (52).

Os integrons de classe 1 foram os primeiros a serem relatados e são os mais prevalentes em isolados clínicos resistentes aos antibióticos, dentre eles, *A. baumannii* MDR o qual vem sendo descrito em várias regiões do mundo. Esta classe de integrons móveis é responsável por conferir resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e a antissépticos (52,83,99,100).

No entanto, apesar dos relatos de maior prevalência de integrons de classe 1 em *A. baumannii*, estudos realizados em países da América do Sul demonstraram maior distribuição de integrons de classe 2 entre isolados dessa espécie nessa região, a exemplo de estudos realizados no Chile, na Argentina (101,102) e no Brasil (103). Ainda no Brasil, uma pesquisa investigou a associação de integrons de classe 2 com linhagens clonais de *A. baumannii* e foi identificada associação de integrons de classe 1 com o CI-1/CC1<sup>PAS</sup> e de integrons de classe 2 com o CI-5/CC79<sup>PAS</sup>, sugerindo que a disseminação de integrons de classe 2 nessa região, pode ser explicada pela alta prevalência do CI-5. Essa classe de integron foi identificada carreando genes de resistência a aminoglicosídeos, sulfonamidas, cloranfenicol e  $\beta$ -lactâmicos (97,104).

Os integrons de classe 3 são mais semelhantes aos da classe 1 e parecem estar associados a elementos móveis como os transposons. Apenas alguns exemplos dessa classe de integrons foram identificados, transportando principalmente genes que codificam resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (52).

Cabe destacar ainda as ilhas genômicas, as quais contêm marcadores de resistência denominados de ilhas de resistência e são definidas com uma região específica dentro do genoma que abriga uma alta concentração de genes transferidos horizontalmente que conferem às bactérias resistência aos antibióticos e metais pesados. Em *A. baumannii* existem numerosas ilhas de

resistência descritas, representadas por AbaR1, AbaR3, AbaR4, AbaR5-Aba19, AbaR25 entre outras. A primeira ilha descrita nesta espécie (AbaR1) foi relatada em uma cepa multirresistente às drogas em 2006 e o sequenciamento do genoma completo desta cepa revelou que esta ilha abrigava um agrupamento de 45 genes de resistência, incluindo *bla*<sub>OXA-69</sub>, membro do grupo *bla*<sub>OXA-51</sub>. Desde então, várias AbaR já foram descritas contendo uma variedade de genes de resistência, dentre os quais *bla*<sub>OXA-23</sub>, que confere resistência aos carbapenêmicos. Essas ilhas foram descritas em cepas epidêmicas de *A. baumannii* pertencentes aos importantes clones internacionais, como o CI-1 e o CI-2, amplamente disseminados em todas as regiões do mundo (83,92,97).

## **1.5 Identificação laboratorial de carbapenemases**

### **1.5.1 Métodos fenotípicos**

Diante da relevância clínica imposta pelas bactérias resistentes aos carbapenêmicos, vários testes fenotípicos têm sido desenvolvidos para detecção de carbapenemases, dentre eles, destaca-se o Teste de Hodge Modificado (THM) que é, provavelmente, a abordagem mais conhecida para a detecção dessas enzimas (105). Trata-se de um teste de disco-difusão em ágar, rápido e simples de ser realizado e pode ser utilizado em laboratórios de microbiologia clínica (106,107). Entretanto, estudos demonstraram que esse teste fenotípico foi confiável apenas para detectar enzimas do tipo KPC e OXA-48 e demonstrou resultados falso-negativos para alguns isolados produtores de OXA-23, bem como, baixa sensibilidade para as MβL com elevados percentuais de resultados falso-negativos para isolados produtores de NDM-1 (105,108,109).

Diante de suas limitações, recomenda-se que o THM seja utilizado para rastreio de bactérias produtoras de carbapenemases e que a distinção entre as bactérias produtoras de MβL das não produtoras de MβL seja utilizado testes fenotípicos com o auxílio de um agente quelante, como o EDTA ou por compostos derivados do ácido tiolático (ex: ácido 2-mercaptopropiônico) (71,109–111).

Apesar dos vários testes fenotípicos disponíveis para detecção de carbapenemases, a identificação dessas enzimas na rotina de laboratórios de microbiologia ainda é um desafio diante da variedade de enzimas produzidas por diferentes espécies bacterianas. No entanto, o conhecimento sobre a epidemiologia local de cada hospital é crucial e contribui para a seleção do melhor método para rastreamento de bacilos Gram-negativos (BGN) produtores de carbapenemases. O ideal é que o teste seja rápido, barato, fácil realização e com alta acurácia (109).

#### 1.5.2 Reação em cadeia da polimerase para detecção de $\beta$ -lactamases

Outro método utilizado para detecção de  $\beta$ -lactamases é a amplificação do DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (do inglês, PCR – *Polymerase chain reaction*). Essa técnica baseia-se na utilização da enzima *Taq* DNA polimerase com iniciadores (*primers*) específicos para a amplificação de regiões selecionadas do genoma. A técnica de PCR possibilita a detecção de genes específicos, como por exemplo genes responsáveis pela produção de enzimas do tipo M $\beta$ L e OXA (112,113).

### 1.6 Métodos de tipagem molecular

Para prevenir infecções e controlar a disseminação de um determinado microrganismo em um hospital, é fundamental conhecer seus possíveis reservatórios, bem como, suas formas de transmissão (34). Ademais, a identificação da origem e da evolução do agente etiológico da infecção, fornece informações importantes para o controle da infecção hospitalar em âmbito local e mundial (114).

Neste sentido, os métodos microbiológicos convencionais, apesar do baixo custo, foram, ao longo das últimas décadas, amplamente substituídos por métodos de tipagem molecular, tendo em vista que estes apresentam um rápido tempo de resposta e alta sensibilidade e especificidade (34,114). Essas metodologias baseiam-se em diferenças na sequência ou na organização do DNA genômico e assim diferenciam cepas bacterianas de uma mesma espécie.

Em geral, cepas com 100% de similaridade genética são consideradas indistinguíveis, aquelas com mais de 80% de similaridade são consideradas relacionadas e cepas com menos que 80% são consideradas distintas. Com base nesses resultados pode-se determinar se as cepas causadoras de um surto são epidemiologicamente relacionadas ou não (115).

Vários desses métodos, com diferentes padrões de resolução, têm sido utilizados para o reconhecimento de distintas linhagens clonais de *A. baumannii* durante surtos hospitalares (33,40,114). Dentre estes, os mais comumente utilizados para realizar a genotipagem de isolados dessa espécie são, *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE), análise de *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), análise de *multiplelocus variable-number tandem repeat analyses* (MLVA), *multilocus sequence typing* (MLST), outras técnicas baseadas em PCR e métodos baseados em sequência e, por fim, *whole-genome sequencing* (WGS) (116). Nesta revisão serão abordados os métodos de PFGE, MLST, algumas técnicas baseadas em PCR e WGS.

#### 1.6.1 *Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE

Mesmo diante dos métodos baseados em sequenciamento agora disponíveis, a técnica de PFGE ainda é considerada o método padrão-ouro para a genotipagem de isolados de *A. baumannii* (34,40). Este método consiste no aprisionamento do DNA cromossômico total das cepas em blocos de agarose, seguido pela digestão com enzimas de restrição, a exemplo das endonucleases de restrição *Apal* que vem sendo utilizada amplamente para analisar a epidemiologia molecular das infecções por *A. baumannii* (116). A separação dos fragmentos é realizada em eletroforese de campo pulsado, onde campos elétricos alternados são aplicados (34). Com base na geração de padrões distintos de fragmentos de DNA cromossômico é possível detectar transmissões bacterianas intra e inter-hospitalares, sendo útil para investigações locais de surtos de curto prazo (40).

Para interpretar padrões de bandas gerados por PFGE e transformá-los em informações epidemiologicamente úteis, é necessário comparar esses padrões considerando que eventos genéticos aleatórios, a exemplo de mutações

pontuais ou inserções e deleções de DNA, podem alterar o perfil de restrição obtido durante um surto. Sendo assim, os isolados analisados poderão ser considerados: (i) geneticamente indistinguíveis das cepas do surto, se seus padrões de restrição tiverem o mesmo número de bandas e as bandas correspondentes tiverem o mesmo tamanho aparente; (ii) intimamente relacionados à cepa do surto, se o padrão PFGE diferir do padrão do surto por até três bandas, o que consiste em um único evento genético; (iii) possivelmente relacionados, se a diferença entre os padrões for de quatro a seis bandas, equivalendo a dois eventos genéticos e, embora esses isolados possam ter a mesma linhagem genética da cepa do surto a probabilidade de serem epidemiologicamente relacionados é baixa e; (iv) não relacionados à cepa do surto, se o padrão PFGE diferir por alterações consistentes com três ou mais eventos genéticos aleatórios, representados por sete ou mais bandas de diferença (115,117).

A análise do padrão das bandas geradas na eletroforese pode ser feita através da visualização da fotografia do gel ou por meio da aquisição da imagem e posterior comparação utilizando *softwares* que fornecem o percentual de similaridade. A vantagem na utilização desses *softwares* consiste na possibilidade de analisar uma grande quantidade de isolados e armazenar essa informação em um banco de dados para análises futuras e eles ainda fornecem uma representação visual da similaridade entre os isolados e a relação genética entre os grupos clonais através da construção de um dendograma (115,117).

#### 1.6.2 *Multilocus Sequence Typing* – MLST

Nos últimos anos, o MLST emergiu como o método padrão-ouro para investigar a estrutura populacional e a epidemiologia global de *A. baumannii* (114,116). Trata-se de um método de tipagem molecular altamente discriminatório e já foi aplicado a uma variedade de patógenos (34).

O MLST é um dos poucos sistemas de biblioteca de tipagem utilizados para estudos epidemiológicos de *A. baumannii*. Esse método baseia-se na amplificação de sete genes conservados (*housekeeping*) do genoma, seguido de sequenciamento. Para esta espécie, atualmente existem dois diferentes

esquemas disponíveis de análise, o esquema Oxford e o esquema desenvolvido pelo Instituto Pasteur (40,114,116).

O esquema Oxford é baseado em comparações de sequências de DNA dos fragmentos internos dos sete genes *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* e *rpoD*. Esse banco de dados inclui 630 diferentes isolados de *A. baumannii* (40,116,118). O esquema mais recente, desenvolvido pelo Instituto Pasteur, inclui 587 isolados de *A. baumannii* e também utiliza sete genes conservados do genoma, incluindo três genes do esquema Oxford (*gltA*, *recA* e *cpn60*) mais quatro outros genes (*fusA*, *pyrG*, *rpoB* e *rplB*) (40,41,116).

Cada um desses genes é sequenciado e a sequência obtida é comparada com as já existentes nos referidos bancos de dados. Para cada sequência diferente de cada gene, é dado um número de alelo único (*allele number*). O número de alelo é fornecido para cada um dos sete genes. Desse modo, a combinação de todos os números de alelos gera o ST (do inglês, *sequence type*), que pode ser comparado com os STs já descritos no banco de dados disponível no site <http://www.pubmlst.org/a.baumannii> para o esquema Oxford e <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/abaumannii.html> para o esquema do Instituto Pasteur (41,118). Um grupo de ST relacionados que compartilham cinco ou mais alelos idênticos levando em consideração os sete genes que são considerados nos esquemas de MLST para *A. baumannii* podem ser agrupados em complexos clonais (CC) por meio de análise do programa de *software* eBURST (<http://eburst.mlst.net>) (40).

As análises do MLST oferecem a possibilidade de troca e comparação dos resultados entre laboratórios, tornando-se um método apropriado para o estudo epidemiológico global e permitir o reconhecimento de clones epidêmicos de *A. baumannii* e o monitoramento de sua disseminação nacional e internacional a longo prazo (34,40).

### 1.6.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR

Alguns métodos de tipagem baseados na técnica de PCR têm sido frequentemente usados para a genotipagem de *A. baumannii*. Esses métodos permitem a tipagem de um elevado número de isolados de um modo simples,

rápido e de baixo custo, pois não requerem equipamentos sofisticados. No entanto, nem todos os métodos são igualmente eficazes, diferindo, no poder discriminatório e na diferenciação dos vários níveis taxonômicos. Dentre esses métodos, o *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR), *Arbitrarily Primed* (AP-PCR) e *Repetitive Extragenic Palindromic* (REP-PCR) têm sido os mais utilizados para tipagem molecular de *Acinetobacter* spp. e todos esses métodos baseiam-se no mesmo princípio, o uso de um ou mais *primers* capazes de amplificar regiões repetidas no DNA bacteriano. A diferença está em qual região será amplificada que será definida pela escolha desses *primers* (34,115,116).

#### 1.6.4 Sequenciamento completo do genoma – WGS

As atuais tecnologias de tipagem molecular têm sido úteis para revelar relações entre isolados de *A. baumannii*, mas são incapazes de demonstrar diferenças entre isolados estreitamente relacionados responsáveis por pequenos surtos, quando as formas de transmissão geralmente não são claras (116).

Diante disso, o sequenciamento completo do genoma vem sendo cada vez mais reconhecido como uma importante ferramenta para estudos de vigilância epidemiológica e tem sido empregado em investigações retrospectivas de surtos, quando o objetivo é identificar fontes ambientais e casos adicionais, como também em investigações de surtos em tempo real, para confirmar a sua existência e acompanhar o surgimento e a disseminação de mecanismos de resistência mutacional (119). Essa tecnologia pode ser utilizada para identificar espécies e investigar a estrutura populacional e disseminação global de bactérias, para analisar em detalhes os surtos hospitalares, a fim de distinguir possíveis vias de transmissão, sugerir formas alternativas de transmissão e identificar pacientes colonizados anteriormente não reconhecidos. Dentre as vantagens deste método incluem-se a capacidade de gerar resultados reproduzíveis e os dados de sequenciamento podem ser facilmente compartilhados (120).



A medida que as tecnologias do WGS continuam a melhorar em relação ao custo, a complexidade e o tempo de resposta decrescente, esse método deve se tornar o padrão-ouro para análises epidemiológicas rigorosas em circunstâncias variáveis, desde surtos locais a surtos em âmbito mundial (116). Podendo, em breve, permitir sua aplicação na tipagem rotineira de bactérias em laboratórios de microbiologia clínica e regularmente incorporado aos programas de vigilância microbiológica e controle de infecções (120), contribuindo para a melhor compreensão da transmissão durante os surtos se utilizado juntamente com dados clínicos e epidemiológicos (119). No entanto, apesar de todas as suas vantagens e benefícios, para muitos contextos clínicos, principalmente aqueles localizados em regiões economicamente menos favorecidas, essa tecnologia ainda parece estar longe da realidade.

## **1.7 Justificativa**

As infecções hospitalares são um grave problema de saúde pública global e a escassez de estudos acerca da epidemiologia clínica e molecular impossibilitam o real conhecimento da magnitude deste cenário em várias regiões do mundo. Tais estudos são fundamentais, pois levantam informações importantes para que se tenha efetivos programas de prevenção e controle da infecção hospitalar. No Brasil, pesquisas que abordem esses aspectos concentram-se, em sua maioria, nas regiões Sul e Sudeste do país.

A escassez de estudos na região Norte, principalmente em Roraima, compromete o entendimento da dinâmica das infecções hospitalares em uma região com características próprias e diferentes das demais regiões do Brasil. O estado de Roraima, é caracterizado por relativo isolamento geográfico, com baixa densidade populacional e está localizado no extremo norte do país, na região Amazônica, em uma área de tríplice fronteira (Brasil, Guiana e Venezuela). Já dentro de seu território limita-se com os estados do Pará e do Amazonas e, abriga importantes áreas de reserva, onde vivem as diferentes etnias indígenas da região.

No que tange a assistência à saúde, é importante aludir que, na capital Boa Vista encontra-se o único hospital geral de referência para adultos que

oferece assistência de média e alta complexidade pelo Sistema Único de Saúde (SUS) a todos os 15 municípios do estado, população de fronteiras e divisas e população indígena. Nesse sentido, essa instituição se mostra de grande importância como unidade de saúde estabelecendo alto fluxo de atendimento e alta taxa de ocupação de leitos em todas as suas clínicas, sobretudo, nas UTIs. Considerando tal fluxo, esse espaço de atenção à saúde se mostra suscetível para a ocorrência de infecção hospitalar e, portanto, monitoramento e caracterização, do ponto de vista dos agentes infecciosos, é estratégico para o estado.

Considerando este contexto, buscou-se aqui realizar a caracterização dos pacientes com infecção hospitalar, bem como, levantar o perfil dessas infecções e, principalmente, determinar a epidemiologia molecular e os determinantes de resistência de isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes do principal hospital de referência para adultos de Roraima, uma vez que, esta espécie tem sido responsável por surtos hospitalares, pelo menos durante o período aqui analisado. Esses resultados agregam informações acerca da disseminação de clones de *A. baumannii* e seus respectivos determinantes de resistência aos carbapenêmicos no país.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Determinação dos aspectos epidemiológicos das infecções hospitalares e caracterização genética de isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos provenientes do principal hospital geral de referência para adultos em Roraima, no período entre 2016 e 2018.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar aspectos demográficos e clínicos dos pacientes com infecção hospitalar no referido hospital;
- Identificar as principais espécies bacterianas relacionadas aos casos de infecção hospitalar;
- Determinar o perfil de resistência antimicrobiana dessas bactérias;
- Determinar a clonalidade dos isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos;
- Identificar genes associados a resistência aos carbapenêmicos nos isolados de *A. baumannii* resistentes a esta classe de fármacos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Tipo e local do estudo**

Foi realizado um estudo epidemiológico, de base hospitalar que descreve a epidemiologia das infecções hospitalares, com foco nas infecções causadas por *A. baumannii*, no principal hospital público de referência para a população adulta de Roraima.

Trata-se do único hospital geral de grande porte que atende exclusivamente pelo SUS a população da região. No momento do desenvolvimento deste estudo, a instituição contava com 11 unidades de internação, incluindo duas UTIs com 10 leitos cada, um centro cirúrgico com 06 salas de cirurgias, um setor de emergência, um pronto atendimento e seis unidades de internação médico-cirúrgicas. Além da assistência direta à saúde, desenvolve também atividades de ensino e pesquisa por meio de convênios com instituições de ensino superior do estado.

Em relação aos aspectos relacionados a identificação, tratamento, prevenção e controle das infecções hospitalares, o hospital conta com um Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) e, na ocasião desta pesquisa, não tinha instituído o programa de gerenciamento para uso racional de antimicrobianos, bem como, não contava com um laboratório de microbiologia em suas dependências. Sendo assim, toda sua demanda de amostras clínicas para análise microbiológica era encaminhada para o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) de Roraima, o qual funciona de segunda à sexta-feira em horário comercial.

#### **3.2 Coleta dos dados**

Os dados foram coletados no SCIH da instituição onde a pesquisa foi realizada e no setor de bacteriologia do LACEN durante o período entre 2016 e 2018.

### 3.2.1 Coleta dos dados clínicos

A coleta dos dados demográficos e clínicos dos pacientes com infecção hospitalar foi realizada no SCIH por meio de um instrumento adaptado da ficha de notificação de infecção hospitalar utilizada neste setor.

Durante o período foram analisadas todas as fichas de notificação de infecção hospitalar produzidas pela SCIH e foram coletadas as seguintes variáveis: idade, sexo, causa de internação, setor de internação, tempo de internação, desfecho do caso, tipo de infecção, amostra clínica coletada, antibióticos utilizados, microrganismo identificado e perfil de resistência aos antibióticos. Quando necessário, os prontuários dos pacientes foram consultados para complementar os dados.

### 3.2.2 Coleta do material microbiológico

No setor de bacteriologia do LACEN os isolados bacterianos provenientes dos casos de infecção foram obtidos a partir de colônias puras crescidas em placas com agar Cled (urina), agar chocolate (sangue) e agar sangue ou MacConkey (secreções em geral e pontas de cateteres) a uma temperatura de 37°C por 12 horas.

Elas foram então repicadas para tubos contendo TSA (Agar Triptona de Soja) sólido inclinado e incubadas a 37°C por 24 horas. Após observação de crescimento, essas culturas foram mantidas sob refrigeração a uma temperatura entre 2°C e 8°C por até três meses, e então, todos os isolados foram encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos (LGMM) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

Simultaneamente, foram coletados os dados presentes na requisição dos exames enviados pelo hospital (idade, sexo, setor de internação, amostra clínica coletada e antibióticos utilizados) e, no resultado do exame liberado pelo LACEN (microrganismo identificado e perfil de resistência aos antibióticos).

Neste laboratório de referência, a identificação da espécie e o teste de suscetibilidade aos antibióticos foram realizados utilizando o sistema VITEK2® (bioMérieux) e os resultados foram interpretados de acordo com os pontos de

corde recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2017) (121).

Os antimicrobianos testados para bactérias Gram-negativas incluíram: amicacina (AMK), amoxicilina-ácido clavulânico (AMX), ampicilina (AMP), ampicilina-sulbactam (AMS), cefepima (FEP), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), cefuroxima (CXM), colistina (COS), ertapenem (ERT), imipenem (IPN), meropenem (MEM), piperacilina-tazobactam (TZP). Para as bactérias Gram-positivas foram testados: ácido fusídico (FOF), clindamicina (CLI), eritromicina (ERY), linezolid (LNZ), moxifloxacina (MFX), oxacilina (OXA), rifampicina (RIF), teicoplanina (TEI) e vancomicina (VAN). Para ambos os microrganismos se testou: gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), sulfametoxazol-trimetoprima (SXT) e tigeciclina (TIG).

### **3.3 Procedimentos no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos**

#### **3.3.1 Meios de cultura e soluções**

A esterilização de todos os meios de cultura foi realizada em autoclave a 120°C, um (1) atm, por 20 minutos.

BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid) – infusão de sólidos de cérebro de bezerro (12,5g); infusão de sólidos de coração de boi (5g); proteose peptona (10g); glicose (2g); cloreto de sódio (5g); fosfato de sódio dibásico (2,5g); pH 7,2 – 7,6. Os compostos foram dissolvidos em 1 litro de água destilada. Para preparo de meio sólido, adicionou-se 1,2% de ágar bacteriológico (Oxoid).

Ágar Mueller Hinton (Difco) – infusão de carne (300g); casaminoácidos (17,5g); amido (1,5g); ágar (17g). Os compostos foram dissolvidos em 1 litro de água destilada e a suspensão foi aquecida até a dissolução completa do ágar.

Ágar Luria Bertani – LB (SIGMA) – Cloreto de sódio (10g); extrato de levedura (5g); triptona (caseína peptona) (10g); Ágar (15g). Os compostos foram dissolvidos em 1 litro de água destilada e a suspensão foi aquecida até a dissolução completa do ágar.

TAE 50X (Tris-acetato-EDTA) (Eppendorf) – Tris-acetato 2M; EDTA 0,05M, pH 8,3.

Salina 0,85% (p/v) – 0,85g de cloreto de sódio em 100mL de água destilada. Autoclavado a 120°C por 20 minutos.

### 3.3.2 Isolados bacterianos

Os isolados de *A. baumannii* utilizados neste estudo pertencem à coleção de culturas do LGMM/IOC, os quais foram obtidos do estoque bacteriano proveniente de diversos espécimes clínicos coletados de pacientes com infecção hospitalar internados nas diferentes unidades de internação do principal hospital de referência para adultos de Roraima, localizado na cidade de Boa Vista, Roraima, os quais foram recuperados no período de outubro de 2016 a maio de 2018. O critério de seleção inicialmente aplicado foi o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos apresentados por esses isolados.

### 3.3.3 Manutenção, estocagem e condições de estocagem dos isolados

Os estoques bacterianos foram feitos a partir de colônias puras crescidas em placa BHI a 37°C por 12 horas. Após o crescimento, as colônias obtidas foram diretamente estocadas em meio BHI líquido acrescido de glicerol 20% a uma temperatura de -20°C e -80°C. Concomitantemente, essas colônias também foram repicadas em 3mL de meio BHI líquido e crescidas a 37°C com agitação constante de 200 oscilações por minuto por 12 a 18 horas. Elas foram então repicadas para tubos contendo BHI sólido inclinado e incubadas a 37°C por 24 horas. Após observação de crescimento, essas culturas foram cobertas com óleo mineral previamente esterilizado e mantidas a temperatura ambiente por até seis meses. Para obtenção de massa bacteriana para os experimentos, foram feitos repiques a partir do estoque para tubos contendo 3-5mL de meio BHI líquido e incubados a 37°C por 12-18 horas com agitação.

### 3.3.4 Identificação dos isolados e teste de sensibilidade aos antibióticos

Os isolados de *A. baumannii* previamente identificadas no LACEN/RR foram confirmadas por sequenciamento dos genes 16S rRNA e *bla*<sub>OXA-51</sub>.

O perfil de resistência dos isolados de *A. baumannii* foi previamente determinado pelo LACEN por meio do sistema automatizado VITEK2® (bioMérieux) e confirmada pelo método de disco difusão em placas contendo agar Mueller-Hinton, de acordo com as recomendações do CLSI (121). Neste último caso, uma colônia obtida em placa com meio BHI foi resuspensa em solução salina 0,85% estéril e a densidade óptica ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala McFarland. A suspensão obtida foi inoculada com o auxílio de *swab* estéril sobre uma placa de ágar Mueller-Hinton. Após alguns minutos, foram aplicados discos impregnados com antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, UK). A cultura foi incubada a 37°C por 18 horas. Os halos de inibição de crescimento bacteriano foram medidos com régua milimétrica e os isolados foram classificados como sensíveis ou resistentes baseando-se nos tamanhos dos diâmetros observados em comparação com os apresentados nos manuais do CLSI (2017) (121). Os isolados foram testados para os seguintes antimicrobianos: gentamicina, amicacina, tobramicina, imipenem, meropenem, doripenem, ciprofloxacina, ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-ácido clavulânico, cefotaxima (CEF), ceftazidima, cefepime, sulfametoxazol-trimetiprina, tetraciclina e minociclina.

A CIM da polimixina B foi avaliada pela microdiluição em caldo com concentrações de antibióticos variando de 0,1 µg/ml a 64 µg/ml e interpretados de acordo com CLSI (2017) (121).

### 3.3.5 Detecção fenotípica de carbapenemases

Para a detecção de carbapenemases, foi utilizado o teste de Hodge modificado conforme previamente descrito por Lee e colaboradores (2001) (122). A superfície do meio Ágar Mueller-Hinton foi inoculada com a suspensão padronizada (0,5 de McFarland) de *Escherichia coli* ATCC 25922 diluída de 1:10. Um disco de imipenem foi colocado no centro e as amostras a serem testadas foram semeadas em estrias perpendiculares. Após incubação, a presença de distorção do halo do imipenem foi considerada como resultado positivo.



### 3.3.6 Extração de DNA pelo método de choque térmico

Os isolados bacterianos foram inoculados em tubos contendo 3mL de caldo BHI e incubados a 37°C por 12-18 horas com agitação, 1mL de cultura de cada amostra foi transferido para um microtubo e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento foi resuspenso em 500µL de salina 0,85% e centrifugado novamente a 3000 rpm por 5 minutos. Essa operação foi repetida mais uma vez. Por fim, o sedimento foi resuspenso em água milli-Q esterilizada e essa suspensão foi submetida a banho-maria fervente (100°C) por 10 minutos, sendo imediatamente submetida a uma temperatura de -20°C. Esse material foi posteriormente descongelado à temperatura ambiente e centrifugado rapidamente (14.000 rpm por 15 segundos) e o sobrenadante utilizados nas reações de PCR.

### 3.3.7 Reação em cadeia da polimerase

Os iniciadores utilizados na reação de PCR estão indicados na tabela 2. Os iniciadores desenvolvidos no LGMM foram definidos com a ajuda do programa PRIMER3 disponível online (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (123,124). Os demais iniciadores foram obtidos a partir da literatura pesquisada. Todos os iniciadores utilizados neste estudo foram testados quanto a sua especificidade.

Para a amplificação de regiões específicas do genoma, a reação de PCR foi realizada em um volume total de 50µL. As reações individuais foram compostas de água Milli-Q esterilizada, tampão reação 1X (Promega), 3mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0,2 mM de cada dNTP (ultrapure dNTP set [dATP, dCTP, dGTP e dTTP] – Amersham), 200ng de cada iniciador, 1,5U da enzima Taq DNA polimerase I (Promega) e 3µL do DNA total obtido por choque térmico, como descrito anteriormente. A reação foi realizada nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 39 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C com duração variando de acordo com o tamanho do alvo, considerando a relação 1 minuto/1Kb.

Para os ensaios de clonagem em sistema heterólogo, as reações de PCR foram realizadas utilizando a enzima Taq DNA Polymerase (Life Technologies). A reação foi realizada nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 39 ciclos a 94°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto e 20 segundos, considerando a relação 1 minuto/1Kb.

A amplificação pela reação de PCR foi visualizada através da corrida de 10µL do produto de PCR em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados neste estudo.

Iniciadores	Sequência nucleotídica (5' → 3')	Região alvo
IMP F	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>
IMP R	GTAAGTTTCAAGAGTGATGC	
VIM F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>
VIM R	AATGCGCAGCACCAGGATAG	
SIM F	GAAGAAGCCCAGCCAGATTT	<i>bla</i> <sub>SIM-1</sub>
SIM R	AGCCCCGAATAGGATTTT	
NDM F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTT	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>
NDM R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
BKC F	ACATAATCTCGCAACGGGCG	<i>bla</i> <sub>BKC</sub>
BKC R	TCGCCGGTCTTGTTTCATCAC	
GES1 F	GCGTTTTGCAATGTGCTC	<i>bla</i> <sub>GES</sub>
GES1 R	CCAGTTTTCTCTCCAACAACC	
SPM F	ACGTTTTCGTCGTCACAG	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>
SPM R	GTCCAGGTATAACAATTTTCG	
KPC F	TTTGTGCTGAAGGAGTTGG	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>
KPC R	TAGTCATTTGCCGTGCCATA	
GIM-1 F	ACTTGTAGCGTTGCCAGCTT	<i>bla</i> <sub>GIM</sub>
GIM-1 R	TATCCTCTGTATGCCAGCA	
OXA-23 F	GATGTGTCATAGTATTCGTCC	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>
OXA-23 R	TCACAACAACAAAAGCACTG	
OXA-58 F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>
OXA-58 R	CATCACCAGCTTTCATTTGC	
OXA-143 F	TTTCTGTCAGTGCATGCTCA	<i>bla</i> <sub>OXA-143</sub>
OXA-143 R	CGAATAGAACCAGGCATTCC	
OXA setA F	ATGAAAAAATTTATACTTCC	<i>bla</i> <sub>OXA-24/40</sub> e outros alelos
OXA setA R	TAAATGATTCCAAGATTTTC	
OXA setB F	ACAGAARTATTTAAGTGGG	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> e outros alelos
OXA setB R	GGTCTACAKCCMWTCCTCA	
OXA58 F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>
OXA58 R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC	

Fonte: LGMM/IOC (2019).

### 3.3.8 Eletroforese em gel de agarose

Os géis foram preparados dissolvendo a agarose em tampão TAE 1X de modo a obter géis com a concentração final de 1,5%. As amostras e 1 $\mu$ L (1 $\mu$ g/ $\mu$ L) do marcador de peso molecular (1Kb DNA Ladder – Promega) foram acrescentados do tampão de amostra com o auxílio do pente. Diferentes volumes foram aplicados no gel dependendo do experimento: foram aplicados 5 $\mu$ L de extração de DNA ou 7 $\mu$ L de produto de PCR. A corrida eletroforética foi feita em tampão de corrida TAE 1X sob uma corrente de aproximadamente 80 Volts por 45 a 90 minutos. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu$ g/mL), observado sob luz ultravioleta e registrado em foto com equipamento Gel Logic 112 (Kodak).

### 3.3.9 Determinação das sequências nucleotídicas (sequenciamento)

Todos os fragmentos amplificados foram purificados com QIAquick PCR Purification Kit – QIAGEN e fragmentos extraídos do gel de agarose foram purificados com QIAquick Gel Extraction Kit – QIAGEN. Posteriormente, os produtos purificados foram utilizados como molde de DNA para a reação de sequenciamento de suas duas fitas com o sistema comercial BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems – Perkin Elmer Co) no sequenciador automático 3730 XL (Life Technology Applied), pertencente a Plataforma de Sequenciamento PDTIS (FIOCRUZ). Esta técnica já está padronizada e vem sendo utilizada rotineiramente pelo LGMM/IOC. As análises das sequências foram realizadas com o auxílio dos pacotes de programas de análise de sequências Chromas (v.2.1.1), Seqman (v.7.0.0), BioEdit (v.7.1.11) e MEGA5 (v.5.3). As sequências foram comparadas àquelas depositadas no banco de sequências GenBank.

### 3.3.10 Tipagem molecular e determinação da clonalidade dos isolados de *A. baumannii* através da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

A tipagem molecular de *A. baumannii* foi realizada através da técnica de PFGE descrita por Tenover e colaboradores (1995) modificada (117). Os isolados bacterianos foram semeados em placas contendo BHI sólido ou Pseudomonas agar base a 37° por 18 horas. Foi utilizada a técnica de esgotamento para a obtenção de colônias isoladas. Três colônias foram inoculadas em 3mL de meio BHI e incubadas a 37° com agitação, até que o crescimento atingisse uma turvação equivalente a escala 2 McFarland. Uma alíquota de 500µL do crescimento bacteriano foi centrifugada e as células obtidas homogeneizadas em 500µL de tampão PIV. Foram adicionados à suspensão de células 500µL de agarose *low melting point* (NuSieve GTC, SMC Bioproducts) 2% em tampão PIV a 60°C. A mistura foi distribuída em moldes e mantida a 4°C por 10 minutos até que solidificassem. Utilizando um bisturi limpo, o molde de agarose solidificado foi cortado em discos de aproximadamente 3mm, que foram então transferidos para tubos contendo 2mL de solução de *lise* e incubados a 37°C por 18 horas. Dessa forma, o DNA genômico foi preparado pelo método de *lise in situ*, em blocos de agarose. Em seguida, o tampão de *lise* foi substituído pelo tampão ESP contendo 0,1mg/mL de proteinase K e os blocos foram incubados a 50°C por 20 horas. Eles foram lavados com tampão TE 4 vezes ao dia durante 6 dias consecutivos. Após as lavagens, os blocos de agarose foram acrescidos de 150µL de reação de digestão contendo água Milli-Q esterilizada, tampão da enzima 1X e 20U da enzima de restrição (normalmente *Apal*), e foram incubados a 37°C por 24 horas. A reação de digestão foi retirada e os blocos de agarose derretidos em banho maria a 65-70°C. Foram aplicados 50µL do material dissolvido. Os fragmentos de restrição foram submetidos a uma eletroforese de campo pulsado e separados em gel de agarose a 1,4% (NA Pharmacia) em tampão TBE 0,5X durante 24-25 horas usando o sistema CHEF-DR III System (BIO-RAD).

Os pulsos utilizados neste experimento foram: etapa 1: 5 s (N/S), 5 s (E/W) por 4 horas; etapa 2: 8 s (N/S), 8 s (E/W) por 5 horas; etapa 3: 12 s (N/S), 12 s (E/W) por 6 horas; etapa 4: 20 s (N/S), 20 s (E/W) por 5 horas; etapa 5: 25 s (N/S), 25 s (E/W) por 3 horas; etapa 6: 30 s (N/S), 30 s (E/W) por 2 horas. Após a corrida o gel foi corado com solução de brometo de etídio, visualizado sob luz

ultravioleta e fotografado para análises posteriores através do equipamento VDS.

Os isolados foram caracterizados como clonais, geneticamente relacionados e, não clonais baseando-se nas diferenças observadas para os perfis de macrorestrição. Perfis que diferiram por até 3 bandas foram considerados clonais. Aqueles padrões de bandeamento que diferiram por até 5 bandas foram considerados geneticamente relacionados e diferenças acima de 5 bandas caracterizaram os isolados não clonais.

### 3.3.11 Determinação do *Sequence Typing* pelo método de *Multilocus Sequence Typing*

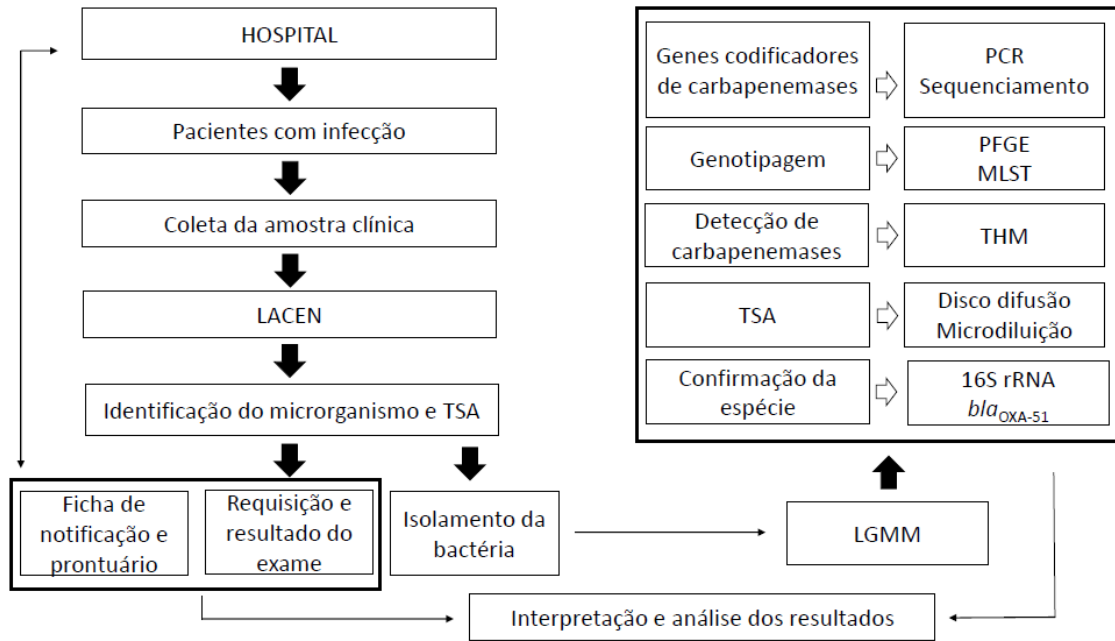
Os isolados de *A. baumannii* foram submetidos ao método de tipagem molecular baseado em sequência de nucleotídeos por meio de dois esquemas: MLST-OD (relativo ao banco de dados Oxford) e MLST-IP (desenvolvido pelo Instituto Pasteur) (40,116,125).

As sequências de nucleotídeos foram submetidas à base de dados dos respectivos esquemas de MLST para *A. baumannii* (MLST-OD, <http://pubmlst.org/abaumannii/> e MLST-IP, <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html>) para designação do número de alelos e STs.

As sequências dos alelos foram analisadas e comparadas com aquelas já existentes no *website* acima descrito para a determinação dos STs.

Levando em conta os sete genes considerados nos esquemas MLST, os STs que compartilhavam cinco ou mais alelos idênticos foram considerados parte do mesmo CC, de acordo com o programa de *software* eBURST (<http://eburst.mlst.net/>) (40).

Figura 3 - Representação esquemática da metodologia.



Fonte: Autoria própria.

### 3.4 Definições e análise dos dados

Foi considerada como infecção hospitalar aquelas notificadas pelo SCIH e/ou identificadas em um tempo maior ou igual a 48h da admissão do paciente no hospital (126).

Para a análise do perfil de resistência bacteriana aos antibióticos utilizou-se os critérios propostos por Magiorakos et al. (2011) que define MDR como aquele isolado que não apresenta suscetibilidade a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos; são considerados XDR (do inglês – *Extensively drug resistant*) os organismos que permanecem suscetíveis a apenas uma ou duas classes e; PDR (do inglês – *Pandrug resistant*) é definido como aquele isolado bacteriano que não apresentar suscetibilidade a todos os agentes em todas as categorias de antimicrobianos. Para todas as três definições, foram considerados não suscetíveis aqueles isolados que apresentarem resistência ou suscetibilidade intermediária a um dado antibiótico, caso contrário esse isolado foi considerado sensível ao antibiótico testado (127).

As classes de antibióticos analisadas neste estudo foram: aminoglicosídeos (GEN, AMK e tobramicina [TOB]), cefalosporinas de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup>

geração (CXM), cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração (CRO, CTX, CAZ, FEP), cefamicinas (CFO e OXA), penicilinas (AMP), penicilinas com inibidores de  $\beta$ -lactamases (TZP, AMX, AMS e ticarcilina-ácido clavulânico [TIR]), CARBAPENÊMICOS (ETP, IPN, MEM e doripenem [DORI]), fluoroquinolonas (CIP e MFX), inibidores da via metabólica do folato (STX), glicilciclinas (TIG), polimixinas (COS), tetraciclina (tetraciclina [TE] e minociclina [MIN]) ansamicinas (RIF), fusidanes (FOF), glicopeptídeos (VAN e TEI), lincosaminas (CLI), macrolídeos (ERY) e oxazolidinonas (LNZ) (127).

Os dados foram tabulados em planilhas do programa *Microsoft Excel*<sup>®</sup> e analisados com auxílio do programa estatístico *Statistical Package for the Social Science* – SPSS versão 20.0. Os dados foram apresentados por meio de frequências absolutas (n) e relativas (%). Para as variáveis contínuas foram calculadas medidas de tendência central (média e mediana) e dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil). Para as variáveis categóricas utilizou-se o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson e para comparação entre grupos utilizou-se o teste Mann-Whitney (U). Para significância estatística, foi atribuído valores de  $p < 0,05$ .

### **3.5 Aspectos éticos**

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Roraima sob parecer nº 1.476.575 e a coleta dos dados e dos isolados bacterianos foram autorizados pelas respectivas instituições que sediaram o estudo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Descrição dos pacientes

No período do estudo (2016-2018) foram identificados 427 pacientes com infecção hospitalar, dos quais 81,7% (n=349) adquiriram uma única infecção e 18,3% (n=78) desenvolveram dois ou mais episódios durante o tempo de internação, totalizando 649 casos de IH.

Quanto aos fatores demográficos, observou-se diferença estatisticamente significativa entre infecção e sexo ( $\chi^2(1)=22,035$ ;  $p<0,001$ ) e infecção e faixa etária ( $\chi^2(5)=72,152$ ;  $p<0,001$ ), com um excesso de casos entre homens (61,4%; 262/427) e idosos (29,3%; 125/427). A média de idade dos pacientes correspondeu a 46,2 ( $\pm 19,3$ ) anos.

Dentre as características clínicas, destacam-se como principais causas de internação as causas externas (34,7%; 148/427), seguida das doenças do aparelho circulatório (19,9%; 85/427) e respiratório (7,0%; 30/427). No que se refere ao setor de internação, aproximadamente metade dos pacientes desenvolveu infecção nas UTIs (48,5%; 207/427), enquanto 35,4% (151/427) dos casos foram diagnosticados nas unidades de internação médico-cirúrgica e 16,2% (69/427) nos setores de emergência e pronto atendimento ( $\chi^2(2)=67,691$ ;  $p<0,001$ ). Cabe destacar ainda que em 23,9% (102/427) dos pacientes a infecção foi causada por dois ou mais patógenos concomitantemente. A taxa de mortalidade foi de 33,3% (142/427).

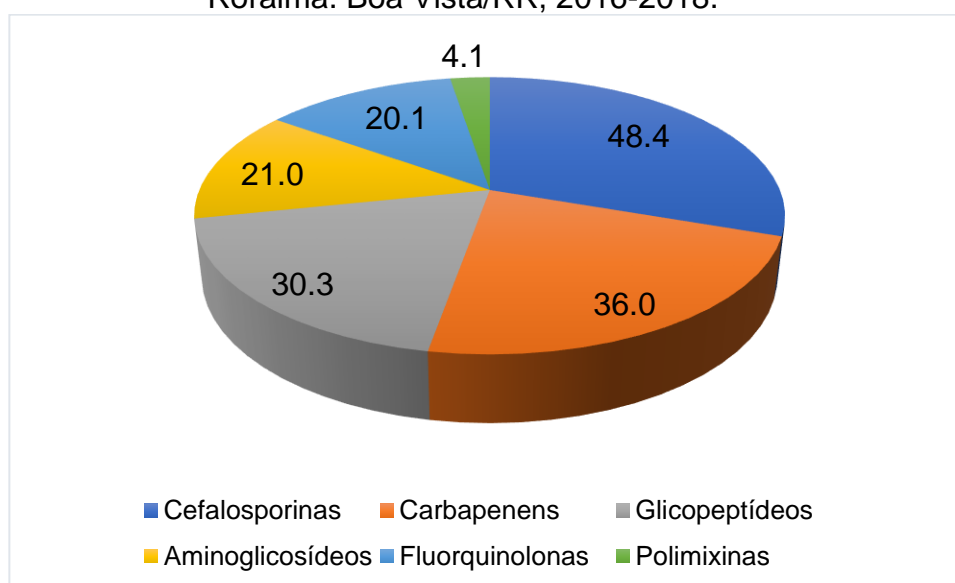
A mediana do tempo de permanência hospitalar foi de 27 dias (quartis=15-45) e 75,2% (321/427) dos pacientes permaneceram internados por mais de 15 dias. Ainda no que se refere a permanência hospitalar, a mediana do tempo de hospitalização dos pacientes que desenvolveram duas ou mais infecções foi de 88,7 dias (quartis=40-115) sendo superior a permanência dos pacientes que desenvolveram uma única infecção, os quais obtiveram uma mediana de 32,4 dias (quartis=15-37) ( $U=4822,00$ ;  $p<0,001$ ).

Outra análise realizada diz respeito ao uso de antibióticos previamente a coleta de material para análise microbiológica, a qual foi identificada em 73,5% (314/427) dos pacientes analisados neste estudo e é demonstrada na figura 3.



A classe dos  $\beta$ -lactâmicos foi a mais utilizada compondo 84,4% do total das prescrições e foram representados principalmente pelas cefalosporinas de amplo espectro (cefepima, ceftriaxona e ceftazidima), as quais somaram 48,4% dos fármacos, seguido dos carbapenêmicos (imipenem) com 36,0% dos antibióticos utilizados. As demais classes prescritas aos pacientes foram os glicopeptídeos (30,3%; n=95), representado principalmente pela vancomicina, seguida dos aminoglicosídeos (21,0%; n=66), tendo a amicacina como o fármaco mais prescrito, as fluoroquinolonas somaram 20,1% (n=63) e foram representadas pela ciprofloxacina e, por fim as polimixinas com 4,1% (n=13) das prescrições, sendo a colistina a droga mais utilizada dentro desta classe.

Figura 4 - Percentual das principais classes de antibióticos prescritas previamente a coleta de material para análise microbiológica nos pacientes com infecção hospitalar no principal hospital de referência para adultos de Roraima. Boa Vista/RR, 2016-2018.



Fonte: dados da pesquisa (2016-2018).

#### 4.2 Descrição das infecções

Dos 649 casos de infecção identificados no período do estudo, 68,7% (446/649) foram causadas por patógenos pertencentes ao grupo ESKAPE. No geral, os microrganismos mais frequentemente isolados foram *A. baumannii* identificado em 22,6% (147/649) dos casos, seguido por *K. pneumoniae* (20,5%; 133/649), *P. aeruginosa* (15,6%; 101/649), *E. coli* (11,4%; 74/649), *S.*

*epidermidis* (6,5%; 42/649), *Enterobacter spp.* (5,2%; 34/649) e *S. aureus* (4,5%; 29/649).

Considerando a prevalência das infecções por *A. baumannii*, procedeu-se a análise dos pacientes que desenvolveram pelo menos uma infecção por essa espécie durante o período de hospitalização, esses dados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Fatores demográficos e clínicos dos pacientes com infecção hospitalar internados no principal hospital de referência para adultos de Roraima, segundo agente etiológico. Boa Vista/RR, 2016-2018.

Variáveis	Total (n=427)	Infecção por <i>A. baumannii</i> (n=106)	Infecção por outras espécies (n=321)	p-valor
	n (%)	n (%)	n (%)	
<b>Sexo</b>				
Masculino	262 (61,4)	71 (67,0)	191 (59,5)	0,170
Feminino	165 (38,6)	35 (33,0)	130 (40,5)	
<b>Faixa etária</b>				
≤ 19 anos	25 (5,9)	9 (8,5)	16 (5,0)	0,137
20 a 29 anos	64 (15,0)	15 (14,2)	49 (15,3)	
30 a 39 anos	74 (17,3)	12 (11,3)	62 (19,3)	
40 a 49 anos	65 (15,2)	12 (11,3)	53 (16,5)	
50 a 59 anos	74 (17,3)	20 (18,9)	54 (16,8)	
≥ 60 anos	125 (29,3)	38 (35,8)	87 (27,1)	
<b>Causa de admissão</b>				
Causas externas e consequências	148 (34,7)	34 (32,1)	114 (35,5)	0,336
Doenças do aparelho circulatório	85 (19,9)	27 (25,5)	58 (18,1)	
Doenças do aparelho respiratório	30 (7,0)	8 (7,5)	22 (6,9)	
Doenças infecciosas e parasitárias	27 (6,3)	9 (8,5)	18 (5,6)	
Doenças do aparelho geniturinário	26 (6,1)	2 (1,9)	24 (7,5)	
Endócrinas, nutricionais e metabólicas	25 (5,9)	5 (4,7)	20 (6,2)	
Doença do sistema osteomuscular [...]	24 (5,6)	4 (3,8)	20 (6,2)	
Neoplasias [tumores]	21 (4,9)	6 (5,7)	15 (4,7)	
Outras causas de internação	41 (9,6)	11 (10,4)	30 (9,3)	
<b>Setor de internação</b>				
UTI	207 (48,5)	69 (65,1)	138 (43,0)	0,001
Enfermarias	151 (35,4)	26 (24,5)	125 (38,9)	
Emergência	69 (16,2)	11 (10,4)	58 (18,1)	
<b>Tempo de internação</b>				
≤ 15 dias	106 (24,8)	29 (27,4)	77 (24,0)	0,486
> 15 dias	321 (75,2)	77 (72,6)	244 (76,0)	
<b>Desfecho</b>				
Alta	198 (46,4)	23 (21,7)	175 (54,5)	0,001
Óbito	142 (33,3)	56 (52,8)	86 (26,8)	
Transferência	87 (20,4)	27 (25,5)	60 (18,7)	

Fonte: dados da pesquisa (2016-2018).

Essa análise demonstrou que as infecções causadas por esse patógeno estiveram estatisticamente associadas ao setor de internação, sendo 65,1% (69/106) destas identificadas nas UTIs ( $\chi^2(2)=15,629$ ;  $p<0,001$ ) e ao desfecho clínico, com 52,8% (56/106) de óbitos entre os pacientes que desenvolveram pelo menos uma infecção por este microrganismo durante o período de hospitalização. Embora não tenha sido observado associação estatística entre infecção por *A. baumannii* e a variável faixa etária, cabe destacar a maior prevalência dessas infecções entre os idosos (35,8%; 38/106).

Quanto a distribuição das amostras clínicas, observou-se que aquelas provenientes do trato respiratório foram as mais coletadas representando 42,8% (278/649) do total, seguida das amostras oriundas de lesões, secreções e abscessos (14,6%; 95/649), ponta de cateter (14,2%; 92/649), sangue (13,4%; 87/649) e urina (10,5%; 68/649). Amostras provenientes de outros locais foram responsáveis por 4,5% (29/649) dos casos (tabela 4).

A distribuição dos principais patógenos de acordo com a amostra clínica demonstrou que *A. baumannii* (31,7%; 88/278) *K. pneumoniae* (23,7%; 66/278) e *P. aeruginosa* (21,6%; 60/278) foram os mais frequentemente isolados de material coletado do trato respiratório. As lesões, secreções e abscessos tiveram como principais espécies isoladas *P. aeruginosa* (18,9%; 18/95) e *K. pneumoniae* (16,8%; 16/95). Nas pontas de cateteres, *A. baumannii* (31,5%; 29/92) e *K. pneumoniae* (19,6%; 18/92) foram os microrganismos predominantes. Enquanto nas amostras clínicas provenientes de sangue e de urina, *S. epidermidis* (24,1%; 21/87) e *E. coli* (52,9%; 36/68) foram os patógenos mais frequentes, respectivamente, conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição dos patógenos isolados de amostras clínicas coletadas dos pacientes com infecção hospitalar internados no principal hospital de referência para adultos de Roraima. Boa Vista/RR, 2016-2018.

Patógeno	Trato respiratório		Lesões		Cateter		Sangue		Urina		Líqu. Cavitários		Outros		Total	
	N	%	N	%	n	%	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%
	<b>Grupo ESKAPE</b>															
<i>A. baumannii</i>	88	31,7	12	12,6	29	31,5	12	13,8	1	1,5	1	7,7	4	25,0	147	22,7
<i>K. pneumoniae</i>	66	23,7	16	16,8	18	19,6	13	14,9	17	25,0	1	7,7	2	12,5	133	20,5
<i>P. aeruginosa</i>	60	21,6	18	18,9	10	10,9	3	3,4	6	8,8	3	23,1	1	6,3	101	15,6
<i>Enterobacter spp</i>	15	5,4	6	6,3	7	7,6	3	3,4	2	2,9	0	0,0	1	6,3	34	5,2
<i>S. aureus</i>	5	1,8	9	9,5	1	1,1	8	9,2	1	1,5	3	23,1	2	12,5	29	4,5
<i>Enterococcus faecium</i>	0	0,0	0	0,0	1	1,1	0	0,0	1	1,5	0	0,0	0	0,0	2	0,3
<b>Outras espécies</b>																
<i>E. coli</i>	12	4,3	12	12,6	4	4,3	8	9,2	36	52,9	1	7,7	1	6,3	74	11,4
<i>S. epidermidis</i>	2	0,7	7	7,4	8	8,7	21	24,1	0	0,0	2	15,4	2	12,5	42	6,5
<i>S. marcescens</i>	5	1,8	3	3,2	3	3,3	2	2,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	13	2,0
<i>E. faecalis</i>	1	0,4	5	5,3	2	2,2	1	1,1	1	1,5	0	0,0	1	6,3	11	1,7
<i>S. coagulase negativo</i>	1	0,4	0	0,0	0	0,0	7	8,0	0	0,0	2	15,4	0	0,0	10	1,5
<i>P. mirabilis</i>	6	2,2	1	1,1	2	2,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	9	1,4
Outros patógenos	17	6,1	6	6,3	7	7,6	9	10,3	3	4,4	0	0,0	2	12,5	44	6,8
<b>Total</b>	<b>278</b>	<b>42,8</b>	<b>95</b>	<b>14,6</b>	<b>92</b>	<b>14,2</b>	<b>87</b>	<b>13,4</b>	<b>68</b>	<b>10,5</b>	<b>13</b>	<b>2,0</b>	<b>16</b>	<b>2,5</b>	<b>649</b>	<b>100,0</b>

Fonte: dados da pesquisa (2016-2018).

### 4.3 Resistência bacteriana aos antibióticos

A resistência antimicrobiana dos patógenos Gram-negativos e Gram-positivos são apresentadas nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Para *A. baumannii*, os percentuais de resistências aos antibióticos foram superiores a 78,2% para todas as classes testadas, exceto para as sulfonamidas (50,0%) e para a colistina (3,5%). Dentre essas, as cefalosporinas de espectro estendido (ceftriaxona) foram as que apresentaram o maior percentual de resistência (97,1%) e as fluoroquinolonas (ciprofloxacina) as que apresentaram o menor percentual (78,2%). De acordo com o teste de sensibilidade aos antibióticos, 55,8% (n=88) dos isolados foram considerados MDR e 30,6% (n=45) XDR. Destaca-se ainda que, embora os atuais critérios de definição de multirresistência às drogas não considerem a tigeciclina entre as espécies de *Acinetobacter*, aqui esse antibiótico foi testado e o percentual de resistência foi de 36,7%.

Os isolados de *K. pneumoniae* demonstraram resistência superior a 72,3% em cinco das dez classes de antimicrobianos testados. Dentre as classes que apresentaram os percentuais mais elevados estiveram as penicilinas (ampicilina) com 100,0%, seguido das cefalosporinas de 1ª e 2ª geração (cefuroxima) com 86,6%. Para todos os isolados de *K. pneumoniae*, 88,0% (n=117) apresentaram perfil de multirresistência às drogas e não foi observado fenótipos XDR.

Os fenótipos de resistência aos antibióticos apresentados pelos isolados de *P. aeruginosa* variou de 6,3% para as polimixinas (colistina) até 57,1% para os carbapenêmicos (imipenem), com exceção das cefalosporinas de espectro estendido (ceftriaxona) que apresentaram percentuais de resistência de 96,9%. No geral, 51,0% dos isolados foram classificados como MDR.

Considerando os isolados de *Enterobacter* spp. os percentuais de resistência mais elevados estiveram relacionados às cefalosporinas de 1ª e 2ª geração (cefuroxima) com 97,0%, seguida das cefamicinas (cefotaxima) com 96,2% e das cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (ceftriaxona e ceftazidima) com 60,6% e 57,1% de resistência respectivamente. A multirresistência aos fármacos testados esteve presente em 67,7% (n=23) dos isolados desta espécie.

Dentre os patógenos Gram-positivos destaca-se *S. aureus*, a resistência desse isolado aos antibióticos variou de 77,3% para a classe dos macrolídeos (eritromicina) a 54,6% para a classe as cefamicinas (oxacilina). As demais classes

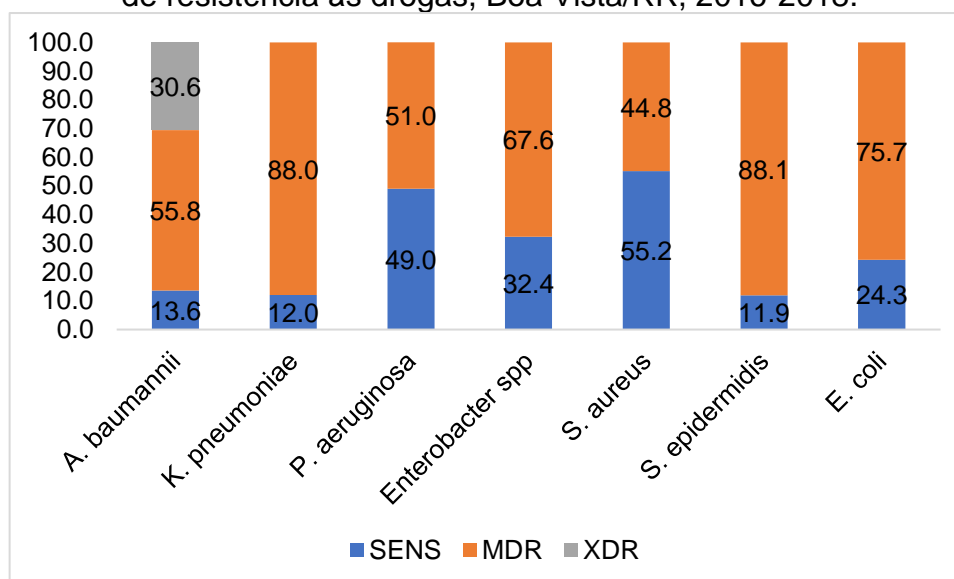
testadas apresentaram percentuais de resistência inferiores a 50,0%, cabe destacar que nenhum isolado desta espécie apresentou resistência a vancomicina. Fenótipo de multirresistência às drogas foi observado em 44,8% (n=13) dos isolados.

Dentre os organismos que não fazem parte do grupo ESKAPE, *E. coli* foi o patógeno Gram-negativo e *S. epidermidis* o Gram-positivo mais frequentemente observado nos casos de infecção.

Para *E. coli* observou-se elevados percentuais de resistências nas classes das penicilinas (ampicilina) com 84,7%, nas fluoroquinolonas (ciprofloxacina) com 74,3%, seguido das cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (ceftazidima) e penicilinas com inibidores de β-lactamases (ampicilina-sulbactam) com 69,2% cada. Para *S. epidermidis*, as taxas de resistência foram superiores a 52,4% em cinco das onze classes testadas, os percentuais mais elevados foram observados na classe dos macrolídeos (eritromicina) com 90,5% e na classe das cefamicinas (oxacilina) com 90,0% de resistência. Quanto aos perfis de multirresistência aos fármacos, os isolados de *E. coli* apresentaram fenótipo MDR em 75,7% (n=56) dos casos e o percentual de *S. epidermidis* multirresistente às drogas foi de 88,1% (n=37). A figura 4 apresenta o percentual dos principais patógenos e seus respectivos perfil de resistência às drogas.

Em análise geral 73,3% (313/427) dos pacientes desenvolveram infecção por patógenos com perfil MDR e XDR.

Figura 5 - Percentual dos principais patógenos provenientes dos casos de infecção hospitalar no principal hospital de referência para adultos de Roraima, segundo perfil de resistência às drogas, Boa Vista/RR, 2016-2018.



Fonte: dados da pesquisa (2016-2018).

SENS: sensível; MDR: *multidrug resistant*; XDR: *extensively drug resistant*.

Tabela 5 - Percentual de antibióticos testados e resistência aos antibióticos dos isolados Gram-negativos pertencentes ao grupo ESKAPE mais *E. coli* provenientes dos casos de infecção hospitalar no principal hospital de referência para adultos de Roraima, Boa Vista/RR, 2016-2018.

Agente Antimicrobiano	<i>A. baumannii</i> (n=147)		<i>K. pneumoniae</i> (n=133)		<i>P. aeruginosa</i> (n=101)		<i>Enterobacter spp</i> (n=34)		<i>E. coli</i> (n=74)	
	% T	% NS	% T	% NS	% T	% NS	% T	% NS	% T	% NS
GEN	98.6	81.4	100.0	42.9	98.0	34.3	100.0	29.4	97.3	37.5
AMK	8.2	83.3	98.5	14.5	99.0	25.0	100.0	8.8	97.3	9.7
CXM	NT	NT	95.5	86.6	NT	NT	97.1	97.0	98.7	67.1
CRO	93.9	97.1	95.5	85.8	97.0	96.9	97.1	60.6	96,0	63.4
CAZ	90.5	88.0	85.7	86.0	85.2	48.8	82.4	57.1	52.7	69.2
FEP	95.2	82.1	99.3	84.9	100.0	41.6	97.1	42.4	91.9	64.7
CFO	NT	NT	79.7	48.1	NT	NT	76.5	96.2	28.2	52.7
AMP	100.0	95.2	97.0	100.0	NT	NT	NT	NT	97.3	84.7
TZP	99.3	85.6	97.7	72.3	99.0	50.0	97.1	45.5	94.6	21.4
AMX	NT	NT	19.6	80.8	NT	NT	14.7	100.0	46.0	44.1
APS	89.1	82.4	83.5	83.8	NT	NT	NT	NT	52.7	69.2
ERT	NT	NT	91.7	32.0	NT	NT	97.1	15.2	91.9	10.3
IPN	91.2	82.8	87.2	31.9	83.2	57.1	85.3	20.7	54.1	15.0
MEM	98.0	81.3	94.7	32.5	96.0	50.5	100.0	17.6	96.0	8.5
CIP	96.6	78.2	96.2	78.1	100.0	39.6	100.0	23.5	94.6	74.3
STX	10,8	50,0	NT	NT	NT	NT	NT	25.0	39.2	65.5
TIG	87,1	36,7	80.5	43.0	NT	NT	82.4	28.6	33.8	0.0
COS	39.5	3.5	48.1	0.0	47.5	6.3	44.1	6.7	51.4	7.9

Fonte: dados da pesquisa (2016-2018).

T: testado; NT: não testado; NS: não suscetível; GEN: gentamicina; AMK: amicacina; CXM: cefuroxima; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; CFO: ceftoxitina; AMP: ampicilina; TZP: piperacilina-tazobactam; AMX: amoxicilina-ácido clavulânico; APS: ampicilina-sulbactam; ERT: ertapenem; IPN: imipenem; MEM: meropenem; CIP: ciprofloxacina; STX: sulfametoxazol-trimetoprima; TIG: tigeciclina; COS: colistina.

Tabela 6 - Percentual de antibióticos testados e resistência aos antibióticos dos isolados Gram-positivos pertencentes ao grupo ESKAPE mais *S. epidermidis* provenientes dos casos de infecção hospitalar no principal hospital de referência para adultos de Roraima, Boa Vista/RR, 2016-2018.

Agente antimicrobiano	<i>S. aureus</i> (n=29)		<i>S. epidermidis</i> (n=42)		<i>E. faecium</i> (n=02)	
	% T	% R	% T	% R	% T	% R
GEN	89.7	15.4	100.0	35.7	100.0	50.0
RIF	100.0	17.2	100.0	52.4	NT	NT
OXA	75.9	54.5	95.2	90.0	NT	NT
CIP	72.4	19.1	97.6	68.3	100.0	100.0
MFX	72.4	19.1	97.6	65.8	100.0	100.0
STX	75.9	9.1	100.0	45.2	NT	NT
FOF	62.1	0.0	88.1	16.2	NT	NT
VAN	75.9	0.0	100.0	0.0	100.0	50.0
TEI	79.3	0.0	100.0	11.9	100.0	50.0
TIG	75.9	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
CLI	72.4	47.6	100.0	88.1	NT	NT
ERY	75.9	77.3	100.0	90.5	100.0	100.0
LNZ	72.4	0.0	100.0	0.0	100.0	50.0

Fonte: dados da pesquisa (2016-2018).

T: testado; NT: não testado; NS: não suscetível; GEN: gentamicina; RIF: rifampicina; OXA: oxacilina; CIP: ciprofloxacina; MFX: moxifloxacina; STX: sulfametoxazol-trimetoprima; FOF: ácido fusídico; VAN: vancomicina; TEI: teicoplanina; TIG: tigeciclina; CLI: clindamicina; ERY: eritromicina; LNZ: linezolid.



#### 4.4 Caracterização genética dos isolados de *A. baumannii*

Dentre os microrganismos recuperados durante o período de coleta dos dados *A. baumannii* recebeu destaque por sua elevada ocorrência, por seu fenótipo XDR e, por ser responsável por surtos hospitalares ocorridos nas UTIs do principal hospital para adultos de Roraima (informações da SCIH). Diante da extrema relevância clínica deste patógeno neste cenário, procedeu-se com a análise fenotípica e genotípica dos isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos recuperados durante outubro de 2016 a maio de 2018.

Neste intervalo de tempo, 101 cepas de *A. baumannii* recuperadas de casos de infecção hospitalar, provenientes de pacientes não repetidos foram analisadas no LGMM, desses 101 isolados, 27 eram resistentes aos carbapenêmicos. A identificação da espécie foi confirmada para todos os 27 isolados por meio do sequenciamento dos genes 16S rRNA e *bla*<sub>OXA-51</sub>.

As análises fenotípicas realizadas no LGMM demonstraram que todos os isolados apresentaram fenótipo XDR, uma vez que eles foram sensíveis somente as polimixinas (COS) e as tetraciclinas (TE e MIN). Todas as cepas foram positivas no teste de Hodge modificado indicando produção de  $\beta$ -lactamases do tipo carbapenemase.

Análises de PFGE e MLST demonstraram que os surtos foram causados por três linhagens XDR que ocorreram concomitantemente no hospital no referido período, essas linhagens foram atribuídas ao ST1<sup>PAS</sup>/ST109<sup>OXF</sup> (Clone C; 33,3%; n=9), ST79<sup>PAS</sup>/ST758<sup>OXF</sup> (Clone A; 44,5%; n=12) e ST78<sup>PAS</sup>/ST944<sup>OXF</sup> (Clone B; 22,2%; n=6) e corresponderam aos CI-1, CI-5 e CI-6, respectivamente.

Dentre os genes investigados observou-se que todos os 27 isolados de *A. baumannii* carreavam genes codificadores de carbapenemases do tipo OXA, sendo que 77,8% (n=21) carreavam *bla*<sub>OXA-23</sub> e 22,2% (n=6) carreavam *bla*<sub>OXA-72</sub>. Verificou-se ainda que *bla*<sub>OXA-23</sub> foi o gene codificador de carbapenemase identificado entre os isolados de *A. baumannii* pertencentes aos ST1<sup>PAS</sup>/ST109<sup>OXF</sup> e ao ST79<sup>PAS</sup>/ST758<sup>OXF</sup> e estavam associados a elementos de inserção, os quais foram encontrados *downstream* IS<sub>Aba1</sub> e IS<sub>Aba3</sub>, respectivamente. Já os isolados atribuídos ao ST78<sup>PAS</sup>/ST944<sup>OXF</sup> carreavam o gene *bla*<sub>OXA-72</sub> os quais eram desprovidos de elementos de inserção. A tabela 7 apresenta as características epidemiológicas, fenotípicas e genotípicas dos isolados de *A. baumannii* analisados neste estudo.

As análises de PFGE também demonstraram que esses clones estavam disseminados pelo hospital, uma vez que, o CI-1 e o CI-5 foram identificados em quatro setores (UTI, emergência e duas enfermarias médico-cirúrgicas) e o CI-6 foi identificado em dois setores (UTI e emergência) durante o período analisado. Esses resultados sugerem a transmissão cruzada de CRAB entre pacientes internados nessas unidades, bem como, a transmissão cruzada ocorrida durante a transferência desses da emergência para a UTI e da UTI para as enfermarias médico-cirúrgicas.

Tabela 7 - Características epidemiológicas, fenotípicas e genótípicas de isolados de *A. baumannii* XDR pertencentes aos Clones Internacionais em surtos ocorridos no principal hospital de referência para adultos de Roraima. Boa Vista/RR, 2016-2018.

Cepa	Data isolamento	PFGE	MLST (IC)	Setor	Amostra clínica	Atividade carbapenemase	IS <i>Aba</i> - <i>bla</i> <sub>OXA</sub>
AB4332	Oct/16/16	B	ST78 (IC-6)	UTI	Secreção traqueal	+	OXA-72
AB4353	Oct/21/16	A	ST79 (IC-5)	UTI	Ponta de cateter	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB5262	Dec/21/16	B	ST78 (IC-6)	UTI	Ponta de cateter	+	OXA-72
AB5375	Dec/29/16	B	ST78 (IC-6)	Emergência	Secreção traqueal	+	OXA-72
AB49	Jan/03/17	C	ST1 (IC-1)	UTI	Ponta de cateter	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB77	Jan/05/17	A	ST79 (IC-5)	Outras	Secreção de ferida	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB715	Feb/12/17	A	ST79 (IC-5)	Emergência	Aspirado brônquico	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB1077	Mar/08/17	A	ST79 (IC-5)	UTI	Secreção traqueal	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB1113	Mar/08/17	A	ST79 (IC-5)	UTI	Líquor	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB283	Apr/25/17	C	ST1 (IC-1)	UTI	Secreção traqueal	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB08	Aug/31/17	B	ST78 (IC-6)	UTI	Sangue	+	OXA-72
AB65	Sep/26/17	C	ST1 (IC-1)	Outras	Tecido ósseo	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB81	Oct/02/17	A1	ST79 (IC-5)	UTI	Secreção traqueal	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB04-RR5	Jan/01/18	A1	ST79 (IC-5)	UTI	Sangue	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB07-RR5	Jan/14/18	C	ST1 (IC-1)	Outras	Sangue	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB28-RR5	Jan/17/18	A	ST79 (IC-5)	UTI	Secreção traqueal	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB37-RR5	Jan/19/18	A	ST79 (IC-5)	UTI	Secreção traqueal	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB40-RR5	Jan/19/18	C	ST1 (IC-1)	UTI	Secreção traqueal	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB39-RR5	Jan/21/18	C	ST1 (IC-1)	UTI	Secreção traqueal	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB51-RR5	Jan/26/18	A	ST79 (IC-5)	UTI	Secreção traqueal	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB07-RR6	Apr/23/18	C	ST1 (IC-1)	Outras	Secreção de ferida	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB04-RR6	Apr/25/18	A	ST79 (IC-5)	UTI	Ponta de cateter	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB06-RR6	Apr/26/18	C	ST1 (IC-1)	UTI	Abscesso hepático	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB01-RR6	Apr/29/18	B	ST78 (IC-6)	UTI	Ponta de cateter	+	OXA-72
AB05-RR6	Apr/29/18	A	ST79 (IC-5)	Outras	Ponta de cateter	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB02-RR6	May/03/18	C	ST1 (IC-1)	Emergência	Secreção traqueal	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB03-RR6	May/15/18	B	ST78 (IC-6)	UTI	Secreção traqueal	+	OXA-72

Fonte: dados da pesquisa (2016-2018).

## 5 DISCUSSÃO

O aumento de condições que proporcionam a internação de indivíduos em situações críticas de saúde juntamente com a elevada ocorrência de bactérias multirresistentes aos antibióticos em ambiente hospitalar vem impactando diretamente nas taxas de infecção adquiridas nesses ambientes. Como consequência, tem-se o aumento da morbimortalidade, o prolongamento do tempo de internação e a elevação dos custos relacionados à assistência, atribuindo às IRAS especial relevância para a saúde pública mundial, fato este já bastante consolidado na literatura (11,13,18,128,129).

Nessas circunstâncias, a determinação do perfil epidemiológico das infecções hospitalares é fundamental, principalmente nos setores críticos dos diferentes serviços de saúde. Tendo em vista que, características do paciente e da infecção que este desenvolve podem influenciar diretamente nas altas taxas de resistência e disseminação de bactérias MDR, o conhecimento desses aspectos pode orientar a implementação de medidas de prevenção e controle direcionadas a esse público (130,131).

Considerando a relevância dessas condições e a importância de conhecê-las, a primeira parte deste estudo teve como objetivo caracterizar alguns aspectos da epidemiologia das infecções hospitalares no principal hospital de referência para adultos do estado de Roraima, com base em dados secundários coletados no SCIH e nos prontuários dos pacientes do referido hospital e nos resultados dos exames microbiológicos emitidos pelo setor de bacteriologia do LACEN.

Quanto às características demográficas, aqui observou-se um excesso de casos de infecção entre homens e entre pacientes com idade avançada. Esses resultados demonstram que o sexo e os extremos de idade são características próprias do paciente que o predispõem ao desenvolvimento de infecção hospitalar (132).

Esse fato provavelmente pode ser justificado pelo perfil da demanda do hospital, uma vez que, trata-se da única instituição de grande porte que atende exclusivamente pelo SUS, sendo referência para toda a população adulta e idosa do estado de Roraima, como ainda para parte da população oriunda das regiões de fronteira e divisas. Sendo assim, recebe todos os casos graves decorrentes, principalmente de causas externas de morbidade que neste estudo representou

34,7% do total das causas de admissão. Dentre as causas externas destaca-se os politraumatismos e os traumatismos cranioencefálicos, os quais acometem principalmente os homens. Quanto aos idosos, estes geralmente são encaminhados ao hospital procedentes de outras instituições de saúde e da rede ambulatorial em decorrência de complicações relacionadas às doenças crônicas, principalmente relacionadas aos aparelhos cardiocirculatório e respiratório, os quais computaram 26,9% das causas de admissão neste estudo (132–135).

Ainda quanto a faixa etária, embora tenha-se registrado uma média de idade de 46,2 anos, quase metade da população (46,6%) foi composta por indivíduos acima de 50 anos de idade. A maior vulnerabilidade às infecções neste público está relacionada com a perda gradual das funções imunológicas e mudanças na resposta inflamatória que ocorrem com o avançar da idade. Associado a isso tem-se ainda as complicações relacionadas às doenças crônicas, altamente prevalente entre os idosos, as quais requerem procedimentos médicos especiais para seu tratamento, a exemplo de terapia com corticosteroides, hemodiálises, cirurgias e internações em UTIs (21,132,134,136,137).

Em termos de fatores extrínsecos, pode-se mencionar a internação em UTIs e o tempo de hospitalização (21). Pacientes sob cuidados intensivos sofrem alteração de suas barreiras naturais devido a gravidade da doença de base e as intervenções terapêuticas as quais são submetidos durante seu período de hospitalização, além das características dos agentes infecciosos nesses setores que também contribuem para o aumento das taxas de infecção hospitalar nessas unidades (22).

O elevado número de internações em UTI (48,5%) aqui encontrado confirmam a gravidade dos casos, com necessidade de tratamento intensivo e de diversos procedimentos invasivos, os quais aumentam o risco de infecção e conseqüentemente de desfechos desfavoráveis, conforme relatado por estudos prévios (133,134,138,139). Destaca-se ainda as UTIs como o local onde as taxas de resistência bacteriana aos antibióticos são geralmente mais altas quando comparados com outros setores hospitalares, tornando a escolha do tratamento um desafio para a equipe de saúde (140,141).

O tempo de hospitalização é outro fator que está intimamente relacionado às IRAS, pois quando prolongado contribui para a sua ocorrência (21,134) e a ocorrência das IRAS também colabora para o prolongamento do tempo de internação, esse ciclo vicioso eleva o risco de mortalidade hospitalar e os custos dos cuidados prestados na instituição (142).

Na presente pesquisa, observou-se um elevado tempo de hospitalização, demonstrado por uma mediana de 27 dias de internação e pelos 75,2% de pacientes internados por mais de 15 dias. Outros estudos também reportam elevado tempo de permanência hospitalar entre pacientes com IRAS, com tempo de internação de 27,2 dias (134) podendo chegar até 40 dias (143). A permanência hospitalar superior a 15 dias também é relatada e varia de 65,8% (131) a 66,4% (134) dos casos.

Outra variável aqui analisada se refere ao número de infecções desenvolvidas por paciente durante o tempo de internação, evidenciando-se que 18,3% dos casos adquiriram duas ou mais infecções durante o período analisado. Observou-se ainda uma diferença estatisticamente significativa entre o tempo de internação dos pacientes que adquiriram duas ou mais infecções, sendo superior ao tempo de permanência daqueles que desenvolveram apenas uma infecção. Reforçando a relação entre tempo de internação e desenvolvimento de infecção hospitalar (144).

Outro ponto a ser realçado se refere ao número de patógenos causadores da infecção, neste estudo 23,9% dos indivíduos adquiriram infecção causada por dois ou mais patógenos concomitantemente. Resultado superior ao encontrado por Savage e colaboradores (2016) no qual 14,7% dos casos de infecção também foram causados por mais de um microrganismo e próximo ao registrado por Sahu et al. (2016) quando esse percentual foi de 28% (126,145). Já o estudo de Guimarães e colaboradores (2011) o qual analisou somente os casos de óbitos relacionados a infecção hospitalar, identificou um elevado percentual (63,7%) de infecções causadas por mais de um organismo (133) demonstrando que o número de patógenos causadores da infecção pode contribuir para a ocorrência de desfechos desfavoráveis em decorrência da gravidade do caso e da limitada opção terapêutica a depender do perfil de resistência do agente causador da infecção.

A utilização de antibióticos previamente a coleta de amostra clínica para análise microbiológica foi identificada na maioria (73,5%) dos pacientes deste estudo, sendo as cefalosporinas e os carbapenêmicos as classes de antibióticos mais prescritas durante o período analisado. Os antibióticos compõem o grupo de medicamentos mais prescritos em ambiente hospitalar e, estima-se que de 20-50% das prescrições desses medicamentos nos hospitais ocorram de forma inapropriada, contribuindo para o surgimento e disseminação de bactérias resistentes às drogas (146). Ademais, vale mencionar que o uso prévio desses fármacos, é frequentemente reportado na literatura como um fator de risco para aquisição de infecção, em especial para aquelas causadas por *A. baumannii* MDR (147). Silva e colaboradores (2018)

evidenciaram elevados percentuais (82,9%) de utilização prévia de carbapenêmicos e demonstraram que a exposição antecipada às cefalosporinas resultou em um risco seis vezes maior de aquisição de infecção por *A. baumannii* produtora de OXA-23 (131). Diante deste contexto, estratégias que promovam o uso racional de antimicrobianos são fortemente recomendadas para reduzir a alta taxa de prescrição desses fármacos e promover o uso apropriado de antibióticos em ambiente hospitalar (146).

Ainda com base na análise dos dados secundários (SCIH e LACEN), observou-se que as amostras clínicas mais coletadas para análise microbiológica foram aquelas provenientes do trato respiratório (42,8%). Em termos de topografia das infecções, dados da SCIH demonstram que no período analisado (2016-2018) as infecções do trato respiratório foram as mais frequentes, sendo a PAV o tipo de infecção respiratória mais notificada.

Assim como outros tipos de infecção hospitalar, as PAVs estão associadas aos procedimentos invasivos, no caso a intubação orotraqueal. É ainda considerada um marcador da qualidade da assistência, uma vez que é passível de prevenção por meio de adoção de pacote de intervenções que considera o custo, a facilidade de implantação e de adesão trazendo impacto significativo na redução dessas infecções e, por isso é uma estratégia fortemente indicada por organizações nacionais e internacionais (1,148,149).

No entanto, as PAVs ainda são altamente prevalentes no Brasil, posto que, aproximadamente 90% das infecções hospitalares correspondem a pneumonia em pacientes intubados (1,12). A mortalidade geral atribuída a este tipo de infecção é alta podendo atingir taxas que variam de 20% a 60% (1,148). Além da alta mortalidade, a PAV prolonga o tempo de permanência hospitalar entre 4 a 12 dias e os custos com os cuidados excedem US\$ 40.000 por episódio (1,133,150,151).

Em termos de agentes etiológicos, constatou-se que 68,7% das infecções hospitalares no hospital do estudo foram causadas pelos patógenos atribuídos ao grupo ESKAPE, com predomínio dos bacilos Gram-negativos, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Este panorama é semelhante ao apontado por pesquisas que vem demonstrando taxas cada vez mais altas de infecções causadas pelas espécies do referido grupo de patógenos (152), a exemplo do estudo realizado em um hospital da Guatemala onde 51,6% dos casos de infecção de corrente sanguínea (ICS) foram causadas por esses patógenos (153), bem como, estudos realizados em Roma e no México, onde as taxas de infecção por patógenos do grupo

ESKAPE corresponderam a 61,7% e 64,5% dos casos, respectivamente (28,29). Destaca-se também que nestas pesquisas houve predomínio dos bacilos Gram-negativos (28,29,153), assim como observado no presente trabalho.

A literatura demonstra que várias espécies bacterianas são capazes de causar infecções em pacientes hospitalizados, no entanto, o grupo ESKAPE merece atenção particular (26,27), pois, por meio de mutação genética e da aquisição de elementos genéticos móveis, esses microrganismos desenvolveram mecanismos de resistência contra oxazolidinonas, lipopeptídeos, macrólídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina,  $\beta$ -lactâmicos, combinações de  $\beta$ -lactâmicos com inibidores de  $\beta$ -lactamases e antibióticos considerados como a última linha de defesa, incluindo carbapenêmicos e glicopeptídeos e até mesmo as polimixinas (53). E para controlar a incidência de infecções causadas por esses patógenos, estudos de vigilância em diferentes cenários são necessários para estabelecer diretrizes hospitalares específicas para uma terapia empírica eficaz (29).

Nos EUA os patógenos atribuídos a este grupo compõem quase metade das espécies responsáveis por infecções de corrente sanguínea e estão associados a maiores períodos de permanência hospitalar, ao aumento do custo da assistência e as elevadas taxas de mortalidade em comparação com patógenos não-ESKAPE. Diante do constante aumento da resistência bacteriana aos antibióticos e do alto custo do tratamento da sepse, é fundamental que a identificação rápida de infecções causadas por esses organismos deva ser uma das principais prioridades dos serviços de saúde (154).

Na América Latina o cenário apresentado por esses patógenos parece ser mais grave, considerando que as espécies pertencentes ao grupo ESKAPE além de liderarem as causas de infecção também tendem a demonstrar taxas mais altas de resistência antimicrobiana em comparação com EUA e países europeus (155) e os bacilos Gram-negativos representam uma proporção significativamente maior de agentes etiológicos causadores de infecções hospitalares na região latino-americana quando comparados com os EUA e o Canadá, com percentuais ainda mais elevados quando essas infecções são causadas por *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa* (156).

No Brasil, estudo realizado em hospitais localizados em Goiás e no Pará reportaram que os patógenos do grupo ESKAPE foram detectados em 51,8% das amostras, sendo representados principalmente por *A. baumannii*, *S. aureus*, *Enterobacter* sp. e *P. aeruginosa*, sendo essas cepas provenientes tanto de amostras clínicas provenientes de pacientes quanto de superfícies inanimadas, nesta última a



coleta foi realizada após limpeza e desinfecção (157). Em hospitais maranhenses registrou-se um elevado percentual de cepas Gram-negativas atribuídas a este grupo de patógenos, dentre elas estavam *A. baumannii* (43,1%), *K. pneumoniae* (25,2%) e *P. aeruginosa* (14,1%) (158), dados semelhantes aos encontrados no presente estudo.

De acordo com ANVISA (2016) *K. pneumoniae* e *A. baumannii* são os organismos Gram-negativos mais frequentemente notificados entre as ICSRC nas UTIs brasileiras, sendo este último o principal microrganismo com perfil de resistência aos carbapenêmicos (159).

Os ESKAPE, com destaque para os Gram-negativos, são considerados um problema para os pacientes hospitalizados, em especial para aqueles sob cuidados intensivos, que pelo fato de estarem criticamente doentes e imunocomprometidos estão vulneráveis a graves infecções bacterianas. Ademais, espécies dentro deste grupo são altamente prevalentes nos hospitais, sendo resistentes a diferentes classes de antibióticos, seja pela sua resistência intrínseca ou, principalmente em decorrência da resistência adquirida ao longo do tempo por meio de elementos genéticos móveis (26,28).

Para tentar minimizar este problema, a OMS vem emitindo alertas sobre a progressiva resistência bacteriana às drogas, em particular para as infecções relacionadas à assistência à saúde, tendo em vista que 70% dessas infecções são causadas por bactérias resistentes às principais classes de antibióticos disponíveis para uso clínico, reforçando a necessidade de pesquisas para desenvolvimentos de novos antibióticos com o intuito de tentar combater o problema da falta de drogas capazes de combater os crescentes mecanismos de resistência aos antibióticos desenvolvidos pelos patógenos do grupo ESKAPE (53,160–162).

Dentre esses organismos, neste estudo destaca-se *A. baumannii* que durante os dois anos analisados foi responsável por 22,6% das infecções nosocomiais, sendo isolado principalmente de amostras provenientes do trato respiratório, esteve estatisticamente associado ao setor de internação (UTI) e ao desfecho do caso (óbito).

Esses dados demonstram que o cenário apresentado em Roraima vai ao encontro daquele descrito por outros estudos os quais reportam *A. baumannii* como um dos principais microrganismos responsáveis por infecções hospitalares, principalmente aquelas relacionadas ao trato respiratório, a exemplo da PAV, sendo isolado principalmente nas UTIs e contribuindo para o maior tempo de hospitalização e para o aumento das taxas de mortalidade (143,163,164).

O sucesso de *A. baumannii* em causar diferentes tipos de infecções nosocomiais, em especial nas UTIs, se deve a vários fatores, dentre os quais destacam-se sua capacidade de resistir à dessecação e sobreviver por longo período em superfícies inanimadas, essa persistência parece contribuir para a sua transmissão, a qual inclui pacientes colonizados, equipamentos e instrumentos médicos contaminados, bem como, as mãos dos profissionais de saúde. Isso pode facilitar a disseminação de clones intra e inter-hospitalar, como também, a dispersão desses em âmbito nacional e internacional, levando a ocorrência de surtos (165–167).

Em termos de resistência, a análise dos antibiogramas emitidos pelo LACEN demonstrou que *A. baumannii* apresentou um elevado percentual (86,4%) de fenótipos de multirresistência às drogas (MDR: 55,8%; XDR: 30,6%), com taxas de resistência superiores a 78,2% para todas as classes de antibióticos testadas, exceto para a colistina (3,5%) e sulfametoxazol-trimetoprima (50,0%) e, embora a tigeciclina não esteja incluída nos critérios atuais de classificação de resistência às drogas (127) esta apresentou taxas de resistência de 36,7%. Esse panorama demonstra que a maioria dos agentes causadores de infecção em Roraima, em especial *A. baumannii*, são representados por aqueles para os quais a resistência a múltiplas drogas reduz as opções terapêuticas (29).

A resistência de *A. baumannii* a múltiplas drogas é uma notável característica desta espécie e está relacionada a sua capacidade de aquisição de genes e desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos que, juntamente com os já intrínsecos à espécie, são responsáveis por este fenótipo (33,165).

O estudo para monitoramento das taxas de resistência antimicrobiana (SMART) avaliou a atividade *in vitro* de isolados de *A. baumannii* coletados de 48 países localizados na seis regiões globais (África, Ásia, Europa, América Latina, Oriente Médio e América do Norte) durante os anos de 2011 a 2014 e identificou que apesar de algumas variações regionais, a suscetibilidade desse organismo às drogas é baixa em todos os locais analisados. Quanto ao perfil MDR dessas cepas observou-se altas taxas em todas as regiões, mesmo na América do Norte, local com os menores percentuais de multirresistência. A resistência foi mais elevada nas UTIs do que nas enfermarias, embora essas últimas apresentaram percentuais preocupantemente altos, especialmente na Europa e no Oriente Médio (168). O impacto desfavorável nas taxas de mortalidade em pacientes com infecções causadas

por essa espécie com opções terapêuticas limitadas são uma preocupação mundial e tem sido o foco de muitas investigações atualmente (28,143).

Com base no cenário levantado a partir da análise dos dados secundários, desenvolveu-se a segunda etapa deste estudo que descreveu a epidemiologia molecular e caracterizou os determinantes de resistência de 27 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, coletados durante outubro de 2016 a maio de 2018, recuperados de pacientes não repetidos, os quais foram responsáveis por surtos persistentes no principal hospital de referência para adultos de Roraima durante o período do estudo. Esses resultados deram origem ao artigo intitulado: “*Acinetobacter baumannii* infections in Amazon Region driven by extensively drug resistant international clones, 2016-2018” publicado na Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz em novembro de 2019 (Apêndice A).

Os 27 isolados de CRAB aqui analisados apresentaram como características resistência a todas as demais classes de antibióticos testadas, exceto para polimixinas e tetraciclinas, determinando assim um fenótipo XDR (127), bem como, a produção de carbapenemase foi detectada em todos os isolados, por meio do teste de Hodge modificado.

*A. baumannii* vem recebendo destaque ao longo das últimas décadas por apresentar resistência a todas as classes de antibióticos disponíveis, caracterizando-o como um patógeno com extensivo perfil de resistência às drogas (33,165). Esse contexto é crítico, tendo posto que, atualmente, os carbapenêmicos são os antibióticos de última escolha para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* MDR. E, com o aumento de relatos de casos de CRAB restam poucas opções terapêuticas disponíveis para tratamento dessas infecções (169).

O número de estudos publicados reportando a ocorrência de CRAB vem aumentando consideravelmente ao longo das últimas duas décadas, passando de um único relato em 2000 (170) para mais de 266 em 2018, destacando a sua disseminação global (42).

O continente europeu concentra diversos relatos de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, dentre os quais pode-se destacar estudos que apontam elevados percentuais (96,9%) de resistência a esses fármacos dentre os isolados analisados com importante perfil de resistência a múltiplas drogas, MDR (32%), XDR (34%) e PDR (31%) de acordo com estudo realizado na Grécia, Itália e Espanha (171). Ainda na Itália outro estudo revelou que 56,6% dos isolados de *A. baumannii*

apresentavam perfil XDR e importantes percentuais de resistência aos carbapenêmicos (165).

Achados semelhantes também são observados no Irã, onde 96,8% dos isolados de *A. baumannii* analisados não apresentavam sensibilidade ao imipenem (172) e 93% apresentavam perfil MDR (173).

Análise de dez anos (2004-2014) realizada nas principais cidades economicamente desenvolvidas e densamente povoadas da China demonstrou o rápido aumento da resistência de isolados de *A. baumannii* ao imipenem de 16,4% em 2004 para 71,4% em 2014 e destacou que as taxas de não suscetibilidade desse organismo a outros agentes antimicrobianos permaneceram altas (>56,4%) durante o período analisado (174). Ainda na Ásia, uma pesquisa nacional longitudinal realizada em Taiwan constatou que, apesar de estáveis, os percentuais de CRAB permanecem elevados ao longo do período estudado, com percentuais de 65,4% em 2010, 76,5% em 2012 e 65,5% em 2014. E, além da resistência aos carbapenêmicos, altas taxas de resistência a fluoroquinolonas, piperacilina-tazobactam e gentamicina também foram observadas (175).

Apesar dos poucos dados sobre a ocorrência de *A. baumannii* resistentes aos antibióticos na África (168) relatos apontam que a suscetibilidade desse organismo ao meropenem, cefepime e piperacilina-tazobactam é inferior a 30%, de acordo estudo realizado na África do Sul entre 2004-2011 (168,176). Uma revisão reporta que em toda África Oriental, apenas duas pesquisas realizadas em Uganda relataram a existência de *P. aeruginosa* (21%) e *A. baumannii* (55%) produtoras de carbapenemases isolados em ambiente hospitalar (177). Já em Harare, Zimbábue observou-se um aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, a exemplo de *A. baumannii* que apresentava taxas de resistência aos carbapenêmicos inferiores a 2% em 2012 passando para 15,4% em 2017. Além disso, observou-se um aumento de organismos prioritários a exemplo de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (178).

Quanto a América Latina, a distribuição dos estudos que analisam a epidemiologia molecular de *A. baumannii* é bastante heterogênea e, dentre a ampla gama de resistência apontada por essas pesquisas, essa parece ser a região onde as taxas de CRAB estão entre as mais elevadas do mundo, com os percentuais mais baixos nos países da América Central e os mais elevados na América do Sul, a exemplo da Argentina e Brasil (169).

Esses estudos confirmam os elevados percentuais de CRAB com perfil XDR, a exemplo de pesquisas realizadas em Lima, no Peru e em diferentes cidades do Chile, os quais evidenciaram altas taxas de resistência aos carbapenêmicos (97,5% e 62%) e elevados percentuais de cepas MDR (52,5% e 57%), XDR (46,3% e 31%) e PDR (1,2% e 3%), respectivamente (179,180). Outro estudo, realizado em 10 cidades argentinas, analisou 100 isolados de *A. baumannii* coletados em 2016 e identificou que todos foram resistentes aos carbapenêmicos e que apesar das grandes distâncias que separam as regiões estudadas, não foi observado diferenças importantes na epidemiologia molecular (carbapenemases e clones predominantes) na população de CRAB (181).

Quanto ao Brasil, um dos países da América Latina com o maior número de estudos publicados sobre epidemiologia molecular de *A. baumannii* (169), observa-se importantes percentuais de resistência aos carbapenêmicos variando de 76,8% a 91,9% (143,164) e com perfil XDR que alternam de 60,7 a 78,3% (182,183).

No geral, pode-se dizer que a epidemiologia global dos patógenos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos aponta para taxas de CRAB cada vez mais elevadas, com 40 a 70% dos isolados responsáveis por infecções adquiridas em UTIs. A exemplo dos EUA onde as taxas de CRAB em ICSRC e ITU-AC correspondem a 47% e 64%, respectivamente. Na Europa em 2017, as taxas de ICS por CRAB foram de 33,4%, e em alguns países, particularmente aqueles no sul e leste europeu, a resistência aos carbapenêmicos foram superiores a 80%. A prevalência de CRAB é igualmente alta em outras partes do mundo, incluindo a América do Sul (40-80%) e Ásia (40-60%) (184).

Dados recentemente apresentados pelo “*SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*”, o qual analisou 13.752 isolados identificados como pertencentes ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* (*Acb*) coletadas de centros médicos localizados na Ásia-pacífico (16,9%), Europa (32,9%), América Latina (24,5%) e América do Norte (25,6%), demonstrou que esses microrganismos apresentaram suscetibilidade reduzida a maioria dos antibióticos testados e ausência de antibióticos com capacidade de inibir o crescimento bacteriano em todos os isolados deste complexo. Observou-se também elevada ocorrência de isolados XDR com os maiores percentuais observados na Europa (66,4%) seguido da América Latina (61,5%). Enfatizou ainda que as taxas de suscetibilidade aos antibióticos caíram continuamente nos períodos de 2009-2012 e 2013-2016, sendo que as taxas

de suscetibilidade aos carbapenêmicos atingiram seus pontos mais baixos na América Latina (13,7% e 14,4%) e na Europa (22,2% e 23,7%) (185).

Diante deste contexto mundial, a prescrição dos carbapenêmicos para tratamento de infecções por CRAB e por outros BGN resistentes a esses fármacos deixa de ser uma opção e o uso de drogas como as polimixinas e a tigeciclina vem sendo utilizadas como uma alternativa terapêutica, uma vez que, esses patógenos comumente exibem baixos níveis de resistência aos referidos medicamentos (109,186). A minociclina também vem apresentando atividade satisfatória, em especial, contra clones de *A. baumannii* MDR produtores de OXA-23 (187). Em todas as regiões geográficas, vem observando-se que a colistina seguida da minociclina são os antibióticos mais ativos contra *Acb* (185) e, além da alta susceptibilidade em isolados de *A. baumannii*, esses antibióticos parecem não ser afetados pela resistência dessas cepas aos carbapenêmicos (188).

Embora altas taxas de resistência às polimixinas em isolados de *A. baumannii* vem sendo relatadas desde 2007 (189), no presente estudo todos os isolados foram sensíveis a colistina e a minociclina concordando com afirmações prévias, as quais demonstram que no Brasil a suscetibilidade desse patógeno às polimixinas ainda permanece alta (156,187), fazendo desse fármaco uma opção para o tratamento de infecções por *A. baumannii* no país (164). A minociclina vem sendo defendida como uma opção terapêutica alternativa para o tratamento de infecções por *A. baumannii* MDR por apresentar boa atividade tanto em isolados produtores de OXA-23 (187) como também naqueles produtores de M $\beta$ L (77), no entanto, apesar do seu potencial, a formulação intravenosa desse medicamento ainda não está disponível no Brasil (77,187).

Apesar da tigeciclina não estar entre os antibióticos avaliados para classificação dos perfis de resistência MDR, XDR e PDR de acordo com os atuais critérios de classificação, por não apresentar pontos de corte específicos para *Acinetobacter* spp. (127), estudos têm avaliado sua atividade em isolados clínicos de *A. baumannii* e os resultados encontrados alteram desde relatos de sua boa atividade (190,191) com níveis relativamente baixos de resistência (164,183) a percentuais de resistência mais elevados variando de 30,9% (143), 43,9% (131) até 100% de resistência (182).

Ainda que a tigeciclina não seja indicada para tratamento da PAV e ICS, Tavares e colaboradores (2019) avaliaram sua atividade em isolados recuperados dessas últimas para fins de vigilância e, não foi observado resistência dessas cepas

a este fármaco (183). Apesar das controvérsias, estudos que reportam a boa atividade da tigeciclina sugerem seu uso como uma droga alternativa para o tratamento de infecções de pele, tecidos moles, meningites e infecções intraventriculares causadas por cepas de *A. baumannii* MDR e XDR resistentes aos carbapenêmicos, embora sua implementação isoladamente ou em combinação com outros antibióticos continue sendo motivo de debate e mais estudos devem ser realizados para demonstrar seus efeitos terapêuticos (164,183,192).

Após a determinação do perfil de resistência dos 27 isolados de CRAB, a próxima etapa deste estudo descreve a estrutura populacional dessas cepas, bem como, seus respectivos determinantes de resistência aos carbapenêmicos.

A estrutura populacional de *A. baumannii* consiste em várias linhagens bem diferenciadas (193) com destaque para a elevada prevalência dos CI (1, 2 e 3) relatados em várias regiões cosmopolitas do mundo (40,41,116). Dentre esses clones, neste estudo identificou-se a ocorrência do CI-1 (ST1<sup>PAS</sup>/ST109<sup>OXF</sup>), pertencente ao CC1<sup>PAS</sup>/CC109<sup>OXF</sup>, aqui representado pelo genótipo C, o qual compôs 33,3% de todos os isolados analisados. Este clone é caracterizado por apresentar uma ampla distribuição internacional, sendo reportado por estudos realizados em mais de 30 países em diferentes continentes, associado a surtos hospitalares e apresentando um perfil de multirresistência às drogas (40).

No Brasil, o CI-1 está bem estabelecido e tornou-se um dos clones predominantes no país. No período entre 2003-2004 e 2007-2008 foi identificado em Curitiba (194) e no Rio de Janeiro (195), respectivamente. Nos anos subsequentes, isolados de *A. baumannii* atribuídos ao CI-1 continuaram sendo identificados nas regiões sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais), centro-oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás) e nordeste (Rio Grande do Norte) (131,143,183,187,196–199). E, além da prevalência do CI-1 em amostras clínicas de pacientes hospitalizados, destaca-se ainda sua identificação em material coletado de superfícies inanimadas em ambiente hospitalar (167). Esses dados demonstram a ampla disseminação do CI-1, fazendo dele o clone mais disseminado em hospitais brasileiros (131,143), assim como observado em outras regiões do mundo.

No entanto, embora tenha sido observada a presença do CI-1 em Roraima, não foi identificado isolados do CI-2 (CC2<sup>PAS</sup>/CC92<sup>OXF</sup>) que, além de ser altamente prevalente em outros países, seu primeiro relato na América Latina ocorreu em um hospital de Curitiba entre os anos 2002 e 2005. Apesar do CI-2 ter sido uma das

principais causas de infecção quando emergiu no Brasil, surpreendentemente persistiu por pouco tempo e foi substituído por outros clones bem sucedidos localmente (194,200). Essa informação pode ser confirmada por estudos posteriores, os quais não relatam a ocorrência do CI-2 (194,195,201,202) fato este também evidenciado por Camargo e colaboradores (2016), uma vez que entre as 71 cepas de CRAB coletados em 23 diferentes cidades no estado de São Paulo, foi identificado um elevado percentual (25%) de cepas do CI-1 e nenhum isolado do CI-2 (203). No entanto, Pagano e colaboradores (2019) relataram a ocorrência do CI (1 e 2) nos isolados de *A. baumannii* em Porto Alegre, no período entre 2013-2014 alertando para a emergência desses clones no sul do Brasil (204).

Além do CI-1, neste estudo também foi identificado a ocorrência do CI-5 (ST79<sup>PAS</sup>/ST758<sup>OXF</sup>), pertencente ao CC79<sup>PAS</sup>, o qual correspondeu ao genótipo A e representou a maioria dos isolados de CRAB aqui analisados (44,5%). Isso demonstra que, apesar da literatura apontar para a ocorrência mundial de infecções causadas pelos CI (1, 2 e 3), estudos vem sugerindo que esse parece não ser o caso da América Latina, pois, embora exista uma quantidade considerável de informações de sequências genômicas geradas para os isolados de *A. baumannii*, essas informações, em geral, são provenientes dos EUA e de países europeus e asiáticos (40,55,193).

Para o continente latino-americano vem se observando a ocorrência de outros clones internacionais como principais causas de infecções nosocomiais por *A. baumannii* (193), com destaque para o CI-5 que vem sendo frequentemente relatado na região e referido como um *worldwide clonal lineages – WW5* por Higgins e colaboradores (2009), uma vez que, em seu estudo, esse clone foi o segundo maior grupo identificado, composto quase que inteiramente por isolados provenientes das Américas (Norte, Central e Sul) e, portanto, considerado um clone pan-americano (55).

Concordando com esses dados, o CI-5 foi um dos clones mais prevalentes em hospitais de Buenos Aires, pelo menos entre 1992-2009, sendo que os CI-1 e CI-2 não foram encontrados durante o período de coleta dos isolados (205). O CI-5 (ST79<sup>PAS</sup>) também foi o clone predominante no Paraguai e em Mendoza na Argentina, além de ter sido detectado em isolados esporádicos no Equador, de acordo com o estudo de Rodríguez e colaboradores (2016) que determinou a epidemiologia molecular de CRAB recuperados de nove hospitais não relacionados localizados em seis países sul americanos nos anos de 2013 e 2014 (206).



O cenário brasileiro parece seguir o padrão latino-americano, uma vez que, vários estudos apontam a ocorrência de infecções nosocomiais causadas por isolados de *A. baumannii* relacionados a diferentes CCs, com destaque para o CC79<sup>PAS</sup> (ST79<sup>PAS</sup>). Conforme reportado por Cieslinski et al. (2013) em que os 46 isolados de CRAB coletados de oito hospitais paranaenses durante o período entre 2009-2011 estavam relacionados a diferentes clones internacionais, dentre eles o CI-5 (207).

Estudo em âmbito nacional, realizado com 155 isolados de *A. baumannii* provenientes de 11 estados pertencentes as cinco regiões do Brasil no período entre 2008-2011 destacou a disseminação nacional do CI-5 (ST79<sup>PAS</sup>/CC79<sup>PAS</sup>), uma vez que este foi encontrado em 7 dos 11 estados participantes da pesquisa (Alagoas, Goiás e Distrito Federal, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte) (196). Fato também observado no estudo que avaliou 46 isolados de *A. baumannii* provenientes de infecções de corrente sanguínea em nove hospitais das cinco regiões brasileiras entre abril e agosto de 2014, dentre os clones identificados destacou-se a ocorrência o CI-5 (ST79<sup>PAS</sup>) demonstrando sua disseminação nas diferentes regiões do país (191).

Relatos recentes demonstram a persistência a longo prazo desse clone endêmico tendo em vista que esse foi o grupo clonal mais importante e disseminado em duas UTIs de um hospital terciário de ensino localizado na cidade de Dourados/MS, sendo detectado ao longo de todo o período do estudo (2013-2015), associado a vários fatores de risco e a altas taxas de mortalidade em pacientes internado nas UTIs (131).

A caracterização da estrutura populacional de isolados de *A. baumannii* também foi realizada em hospitais de Porto Alegre, em dois períodos distintos, durante o primeiro surto de CRAB (2007-2008) e cinco anos depois, quando o CRAB alcançou níveis endêmicos (2013-2014). Dentre os vários CCs identificados nos dois períodos, destaca-se a ocorrência dos clones de alto risco pertencentes ao CC79 que estavam relacionados ao primeiro surto de CRAB e persistiram até 2014 (204).

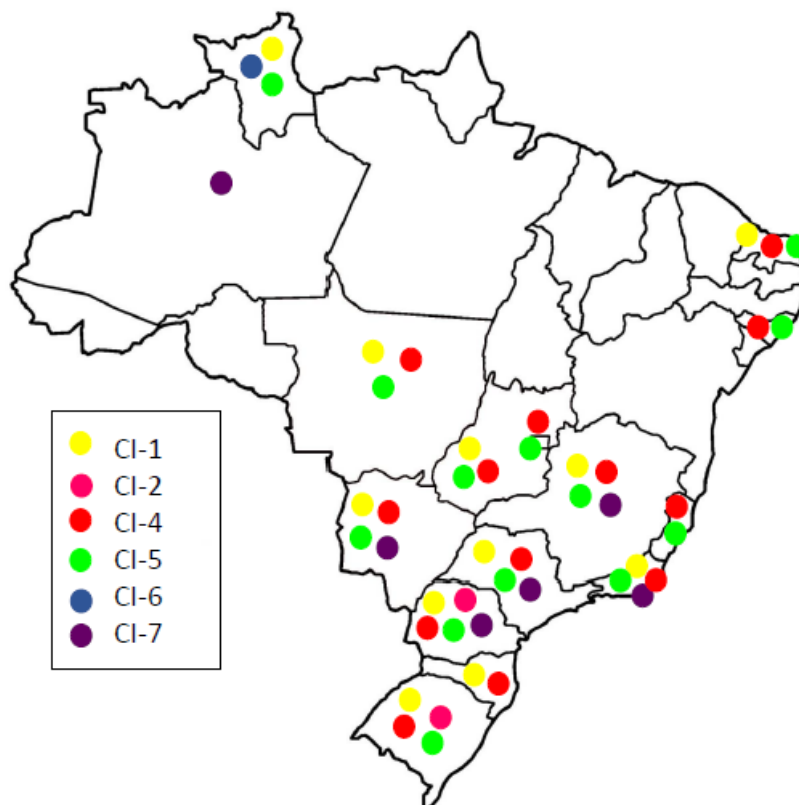
De acordo com a literatura apresentada, Roraima parece seguir o padrão latino-americano e brasileiro, uma vez que, dois dos três clones identificados no hospital analisado estão entre os mais prevalentes na região (CI-1 e CI-5). Porém, neste estudo, identificou-se um terceiro clone, aqui representado pelo genótipo C, que totalizou 22,2% dos isolados analisados sendo atribuído ao CI-6 (ST78<sup>PAS</sup>/ST944<sup>OXF</sup>).

Este clone também corresponde a uma linhagem pandêmica de alto risco que desde 2006 vem sendo identificada em países europeus, a exemplo da Itália (208),

Rússia (209), Grécia (210) e Alemanha (211), bem como, na Ásia (212) e em países do continente americano, EUA (213) e Guiana Francesa (214). Trata-se de um clone extensivamente resistente às drogas, incluindo os carbapenêmicos, com sensibilidade apenas a colistina. Além disso, é predominantemente isolado de amostras provenientes do trato respiratório e sangue, de pacientes internados em unidades de terapia intensiva, com longo período de hospitalização (208,210,213,214).

Curiosamente, considerando o Brasil, o CI-6 parece estar restrito a esse cenário clínico na região Amazônica, uma vez que, até o momento, não há relato de sua ocorrência no país e é descrito pela primeira vez neste estudo, embora esteja envolvido com surtos em todo o mundo há mais de uma década (40,208). Esses achados reforçam a persistência temporal e espacial e o potencial de disseminação dessas três linhagens pandêmicas (CI - 1, 5 e 6), uma vez que eles também foram identificados em um cenário clínico da região Amazônica, pelo menos durante o período entre 2016-2018. Para melhor visualização do cenário nacional, a figura 6 apresenta a distribuição geográfica dos principais clones internacionais de *A. baumannii* identificados no Brasil.

Figura 6 - Representação geográfica da distribuição dos principais clones internacionais de *A. baumannii* no Brasil.



Fonte: Azevedo et al. (2019); Chagas et al. (2014); Cieslinski et al. (2013); Martins et al. (2013); Pagano et al. (2019); Provasi Cardoso et al. (2016); Schimith et al. (2010); Silva et al. (2018); Tavares et al. (2019); Vasconcellos et al. (2017) e dados desta pesquisa (2016-2018).

Quanto aos determinantes de resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos, este usualmente é mediado por  $\beta$ -lactamases de Classe D pertencente à família OXA, codificados pelos genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-143-like</sub> e *bla*<sub>OXA-235-like</sub> (215). Dentre os genes codificadores de carbapenemases encontrados no CI-1 estão *bla*<sub>VIM-4</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub> e *bla*<sub>OXA-58-like</sub> (40) e no CI-5, *bla*<sub>OXA-23</sub> (196). Concordando com os resultados deste estudo, no qual o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foi encontrado em 77,7% dos isolados, sempre associado a sequências de inserção IS*Aba* e esses isolados foram atribuídos aos CI-1 e ao CI-5.

O gene *bla*<sub>OXA-23</sub>, em associação com as sequências IS*Aba*, é uma das CHDL mais difundidas entre *A. baumannii* em hospitais brasileiros e tem sido disseminado no país pelas linhagens pandêmicas de alto risco atribuídas aos CC1<sup>PAS</sup> (CI-1), CC79<sup>PAS</sup> (CI-5) e CC15<sup>PAS</sup> (131,169,187,191,196,216).

Entretanto, a maioria desses estudos concentra-se em contextos clínicos localizados em cidades densamente povoadas, com destaque para a região sul, onde o primeiro isolado de *A. baumannii* produtor da enzima OXA-23 foi descrito (217) e estudos subsequentes, também desenvolvidos no sul do país, os quais reportam a disseminação de CRAB produtor de OXA-23 (218), bem como, sua associação com outros clones (CI-4 e CI-7) (207). A ocorrência de CRAB produtor de OXA-23 também é descrita na região sudeste, tanto em ambiente hospitalar (182,183,201,203), como fora dele, destacando a importância da vigilância ambiental dessas bactérias que podem ser fontes potenciais de genes de resistência aos antibióticos de relevância clínica e a necessidade urgente de adoção de medidas drásticas de controle sanitário tanto doméstico quanto hospitalar (216).

Corroborando com os estudos supracitados, foi demonstrado aqui que os isolados pertencentes aos CC1<sup>PAS</sup> (ST1/CI-1) e CC79<sup>PAS</sup> (ST79/CI-5) produtores de OXA-23 também são prevalentes em um ambiente clínico da região Amazônica, reforçando a disseminação dessas cepas de norte a sul do Brasil. Da mesma forma, verificou-se que *bla*<sub>OXA-23</sub> foi o gene codificador de carbapenemase mais prevalente entre esses clones e foi associado a IS*Aba*, encontrados *downstream* IS*Aba*1 (CI-1) e IS*Aba*3 (CI-5), o que explica a resistência aos carbapenêmicos observadas nessas cepas.

Os elementos IS desempenham um importante papel na mobilização e expressão de  $\beta$ -lactamases do tipo OXA, em especial nas oxacilinas encontradas nas espécies de *Acinetobacter*, nas quais esses elementos são frequentemente identificados em associação com genes codificadores dessas enzimas. Considerando

*A. baumannii*, IS*Aba1* é a sequência de inserção mais prevalente e parece ser encontrada exclusivamente nessa espécie, apesar de ser comum a ocorrência de IS*Aba3*, principalmente associada ao gene *bla*<sub>OXA-58</sub> geralmente com uma cópia *upstream* e uma cópia *downstream* aos genes codificadores de β-lactamases formando um transposon composto (34,82).

Considerando a ocorrência de CHDL no Brasil, há pouco menos de uma década, apenas dois grupos dessas enzimas, OXA-23 e OXA-143, tinham sido identificados em isolados clínicos de *A. baumannii* em hospitais brasileiros (219,220). E as elevadas taxas de resistência dessa espécie aos carbapenêmicos eram atribuídas a disseminação de clones produtores de OXA-23 (196).

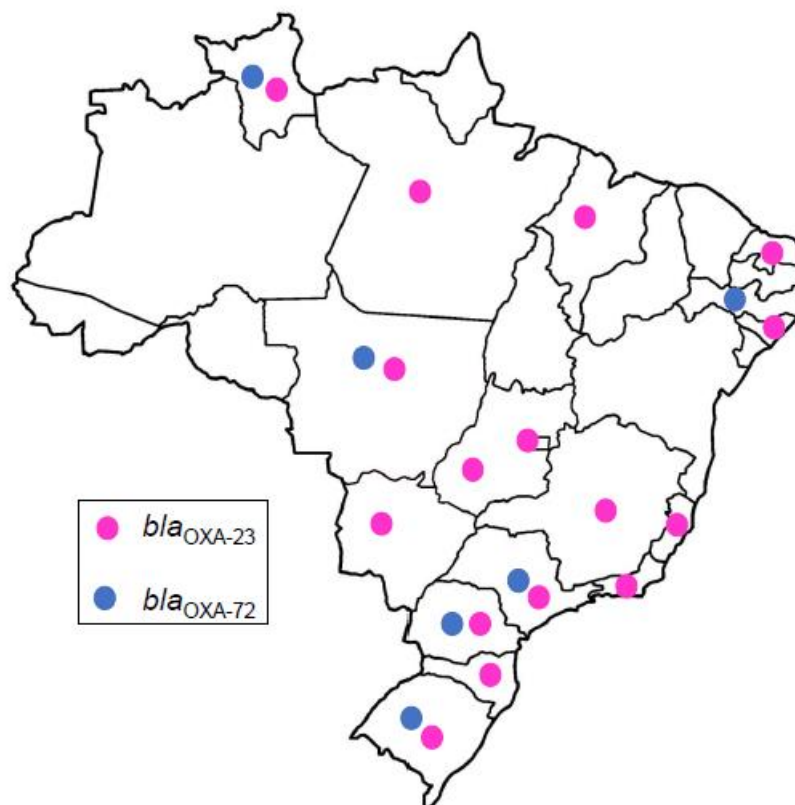
No entanto, a enzima OXA-72 β-lactamase, uma variante do tipo OXA-24/40, que foi identificada pela primeira vez em isolados de *A. baumannii* recuperados na Tailândia em 2004 vem sendo descrita em vários países (211), incluindo países latino-americanos, a exemplo da Colômbia, Equador e México, bem como, o Brasil (221). Esse fato demonstra o aumento da diversidade de grupos de CHDL relatados mundialmente levantando uma preocupação com o potencial de disseminação dessa carbapenemase (222).

Quanto ao Brasil, *A. baumannii* produtor de OXA-72 passou a ser descrito em 2011, entre um isolado clínico coletado em 2007 (219) e entre dois isolados coletados em hospitais localizados em São Paulo durante os anos 2004-2008 (88).

A partir de então, a ocorrência de OXA-72 entre *A. baumannii* passou a ser reportada por estudos desenvolvidos em hospitais de ensino no Recife (223) e em cidades das regiões sul e sudeste do Brasil, sendo que, nessas últimas os isolados estavam associados, principalmente aos CC15<sup>PAS</sup> (ST180 e ST890) e CC7<sup>PAS</sup> (ST79 e ST730), os quais são altamente endêmicos no Brasil (183,191,224,225). E agora, *A. baumannii* produtor da enzima OXA-72 é relatado, pela primeira vez, fora de uma região metropolitana, em um cenário clínico localizado na região norte do Brasil estando associado ao CI-6 (ST78<sup>PAS</sup>).

A figura 7 apresenta a distribuição dos principais genes codificadores de CHDL em isolados de *A. baumannii* no Brasil.

Figura 7 - Representação geográfica da distribuição dos principais genes codificadores de CHDL em isolados de *A. baumannii* no Brasil.



Fonte: Azevedo et al. (2019); Camargo et al. (2016); Chagas et al. (2014); De Sá Cavalcanti et al. (2013); Pagano et al. (2017); Provasi Cardoso et al. (2016); Silva et al. 2018; Tavares et al. (2019); Vasconcelos et al. (2015) e dados desta pesquisa (2016-2018).

Embora no presente estudo, os isolados atribuídos ao CI-6 apresentaram a produção de enzimas do tipo OXA-72 como mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, relatos prévios demonstram que esse clone apresenta uma ampla diversidade genética. Em sua primeira descrição na Itália, concluiu-se que o CI-6 se disseminou com sucesso entre as diferentes enfermarias de um hospital e foi selecionado devido à presença do gene *bla*<sub>OXA-58</sub>, carregado por plasmídeos (208). No entanto, estudos subsequentes demonstraram a associação do CI-6 com os genes *bla*<sub>OXA-23</sub> (214) e *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub> (209–211,213).

Diferentemente das outras  $\beta$ -lactamases do tipo OXA encontradas em *Acinetobacter spp.*, os genes *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub> raramente são detectados em associação com IS (82). De fato, aqui o gene *bla*<sub>OXA-72</sub>, presente em isolados clínicos de *A. baumannii* atribuídos ao CI-6, foi identificado flanqueado por locais de ligação XerC/XerD.

Esse fato foi previamente descrito por D'Andrea e colaboradores (2009), uma vez que, ao analisarem o contexto genético do gene *bla*<sub>OXA-24/40</sub> isolado de um paciente

internado em um hospital do norte da Itália em setembro de 2000, não identificaram estruturas tipicamente envolvidas na sua mobilização. No entanto, *bla*<sub>OXA-24/40</sub> foi carregado em um módulo de DNA inserido entre repetições invertidas conservadas homólogas aos locais de ligação XerC/XerD que, em outros plasmídeos, flanqueiam módulos de DNA de diferentes tamanhos e composições, sugerindo que a mobilização desses genes de resistência se deva a um novo mecanismo de recombinação sítio-específico (226).

Dois estudos posteriores realizados em um mesmo hospital de Madri durante um grande surto ocorrido entre 2006-2008, identificaram que a resistência aos carbapenêmicos em clones de *A. baumannii* e *A. calcoaceticus* estava relacionada ao gene *bla*<sub>OXA-24/40</sub>, o qual foi identificado flanqueado por locais de ligação XerC/XerD localizados em diferentes plasmídeos (227,228).

Vários relatos subsequentes reforçam a hipótese de que mesmo na ausência de IS*Aba* o gene *bla*<sub>OXA-72</sub> tem contribuído para a resistência aos carbapenêmicos ao demonstrarem que o sítio de ligação do tipo XerC/XerD está envolvido na mobilização desse a partir de diferentes plasmídeos em *Acinetobacter* spp. (175,222,229–232).

Os diversos estudos aqui referenciados relatam a presença do gene *bla*<sub>OXA-72</sub> em diferentes *Acinetobacter* spp., STs, plasmídeos e países, incluindo o Brasil. Esses dados epidemiológicos demonstram o potencial de mobilização desse gene e a sua associação com locais de ligação homólogos aos reconhecidos pelas recombinases XerC/XerD pode explicar a heterogeneidade de contextos genéticos (diferentes plasmídeos) nos quais *bla*<sub>OXA-72</sub> vem sendo encontrado.

Estudos que analisem a epidemiologia molecular de *A. baumannii*, sejam em âmbito local ou nacional, são úteis quando se pretende determinar a relação clonal entre isolados dessa espécie e assim estabelecer a dinâmica de transmissão das infecções causadas por esses organismos, bem como, para monitorar a disseminação de diferentes clones epidêmicos e seus determinantes de resistência aos antibióticos. Esses resultados podem guiar medidas de prevenção e controle dessas infecções (116).

Sendo assim, por meio de PFGE e MLST, foi possível estabelecer a epidemiologia molecular de CRAB em um importante hospital de Roraima. Com base nos resultados, tem-se registro da ocorrência de 3 grupos clonais (A, B e C) atribuídos a 3 clones internacionais (5, 6 e 1), respectivamente, os quais circulam, pelo menos, em quatro setores deste hospital (UTI, emergência e duas enfermarias médico-cirúrgicas), durante o período entre 2016-2018.

Esses resultados indicam a disseminação intra-hospitalar de CRAB, provavelmente ocorrida por meio de transmissão cruzada entre os pacientes nos referidos setores, bem como, durante a transferência desses da emergência para a UTI e da UTI para as unidades de internação médico-cirúrgicas. Fato este já descrito previamente (214).

Considerando que características próprias de *A. baumannii*, como sua capacidade de resistir à dessecação e sobreviver por longo tempo em superfícies inanimadas contribuem para sua transmissão, a qual pode ocorrer por meio de pacientes colonizados, equipamentos e instrumentos médico-hospitalares contaminados e pelas mãos dos profissionais de saúde (165–167). Se faz urgente, além da aplicação de medidas efetivas de esterilização e desinfecção de materiais e equipamentos, bem como, a garantia de adesão dos profissionais às técnicas assépticas e aos *bundles* de prevenção, estratégias que tenham como objetivo a identificação de pacientes colonizados por CRAB, principalmente nos setores de emergência e nas UTIs e a aplicação de precaução de contato desses antes de sua transferência para outros setores são de grande importância para interromper a disseminação intra-hospitalar e evitar a transmissão inter-hospitalar desses clones na região (214).

Cabe destacar ainda a necessidade da implementação de programas de gerenciamento do uso de antimicrobianos em ambientes hospitalares e comunitários com vistas a reduzir a morbimortalidade e os custos associados com resistência bacteriana às drogas, bem como, para garantir a alta qualidade e eficácia das opções terapêuticas oferecidas à população (233). O conjunto das medidas supracitadas ajudarão a minimizar o surgimento e a persistência de cepas de *A. baumannii* adaptadas ao ambiente hospitalar (234).

## 6 PERSPECTIVAS

- Pesquisas com o objetivo de determinar a prevalência das infecções hospitalares, bem como, os fatores de risco associados a aquisição destas infecções, com base em dados primários serão realizadas, a fim de complementar os resultados obtidos na primeira etapa deste estudo;
- Pesquisas relacionadas ao uso de antibióticos em ambiente hospitalar serão realizadas juntamente com o Serviço de Prevenção e Controle de Infecção do, com vistas a levantar informações para a implantação do programa de gerenciamento do uso de antibióticos;
- Monitoramento das bactérias causadoras de infecção hospitalar nos principais hospitais de referência de Boa Vista e seus respectivos perfis de resistência continuarão a ser realizados com o propósito de identificar alterações na epidemiologia local dos agentes causadores dessa infecção, como também analisar a possível disseminação dos clones de *A. baumannii*, identificados neste estudo, em outras instituições hospitalares de Boa Vista/RR.



## 7 CONCLUSÕES

Esse estudo desvendou, pela primeira vez, o contexto epidemiológico das infecções hospitalares, com destaque para epidemiologia molecular das infecções causadas por *A. baumannii*, em um importante hospital de Boa Vista, Roraima, cidade localizada na região Amazônica.

No geral, as infecções hospitalares acometeram, principalmente, homens, idosos, pacientes internados nas UTIs e pacientes com longo período de internação. Essas infecções foram causadas, predominantemente, por patógenos atribuídos ao grupo ESKAPE, com destaque para os bacilos Gram-negativos, em especial *A. baumannii*. Sendo as infecções por este último patógeno associadas a setor de internação (UTI) e desfecho do caso (óbito).

A análise dos 27 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, responsáveis por surtos hospitalares no período entre 2016 e 2018, demonstrou que todas as cepas eram produtoras de carbapenemases e apresentavam perfil extensivamente resistente às drogas, com sensibilidade apenas às polimixinas e às tetraciclínas.

Verificou-se que as infecções por CRAB foram causadas concomitantemente por três clones internacionais (1, 5 e 6), sendo o CI-6 relatado pela primeira vez no Brasil aqui neste estudo.

O gene *bla<sub>OXA-23</sub>* foi detectado em todos os isolados atribuídos ao CI-1 e CI-5, sempre associado a sequências de inserção do tipo IS*Aba*1 e IS*Aba*3, respectivamente. Enquanto as cepas do IC-6 carreavam o gene *bla<sub>OXA-72</sub>*, flanqueados por locais de ligação XerC/XerD.

O cenário apresentado em Boa Vista assemelha-se ao observado em outras regiões cosmopolitas do mundo, uma vez que, os surtos hospitalares foram causados por clones internacionais, os quais são mundialmente disseminados. Tal situação provavelmente se deve à capacidade de persistência e sobrevivência de *A. baumannii* em ambientes hospitalares, juntamente com a transmissão pessoa a pessoa e a mobilidade humana global.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Brasília; 2017.
2. de Oliveira HM, Silva CPR, Lacerda RA. Policies for control and prevention of infections related to healthcare assistance in Brazil: A conceptual analysis. *Rev da Esc Enferm.* 2016;50(3):502–8.
3. Nogueira C, Padoveze MC, Lacerda RA. Governmental surveillance system of healthcare-associated infection in Brazil. *Rev da Esc Enferm.* 2014;48(4):657–62.
4. Costa R, Padilha MI, Amante LN, Costa E, Bock LF. O Legado De Florence Nightingale: Uma Viagem No Tempo. *Out-Dez.* 2009;18(4):661–9.
5. Padilha MIC de S, Mancia JR. Florence Nightingale e as irmãs de caridade: revisitando a história. *Rev Bras enfermagem.* 2005;58(6):723–6.
6. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med.* 2012;27(2):128–42.
7. Powers JH. Antimicrobial drug development - The past, the present, and the future. *Clin Microbiol Infect Suppl.* 2004;10(4):23–31.
8. Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(1):71–109.
9. Munita JM, Arias CA, Unit AR, Santiago A De. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *HHS Public Access.* 2016;4(2):1–37.

10. Iordanou S, Middleton N, Papathanassoglou E, Raftopoulos V. Surveillance of device associated infections and mortality in a major intensive care unit in the Republic of Cyprus. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):1–8.
11. Padoveze MC, Fortaleza CMCB. Healthcare-associated infections: Challenges to public health in Brazil. *Rev Saude Publica.* 2014;48(6):995–1001.
12. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde [Internet]. Brasília; 2017. (Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde). Report No.: 2. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3507912/Caderno+2+-+Critérios+Diagnósticos+de+Infecção+Relacionada+à+Assistência+à+Saúde/7485b45a-074f-4b34-8868-61f1e5724501>
13. Allegranzi B, Nejad SB, Combescure C, Graafmans W, Attar H, Donaldson L, et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: Systematic review and meta-analysis. *Lancet* [Internet]. 2011;377(9761):228–41. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61458-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61458-4)
14. Khan HA, Baig FK, Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2017;7(5):478–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>
15. WHO. Health care-associated infections - Fact sheet. World Health Organization. 2014.
16. Zarb P, Coignard B, Griskeviciene J, Muller A, Vankerckhoven V, Weist K, et al. The european centre for disease prevention and control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Eurosurveillance.* 2012;17(46):1–16.

17. Magill SS, O'Leary E, Janelle SJ, Thompson DL, Dumyati G, Nadle J, et al. Changes in prevalence of health care-associated infections in U.S. Hospitals. *N Engl J Med*. 2018;379(18):1732–44.
18. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*. 2014;370(13):1198–208.
19. Fortaleza CMCB, Padoveze MC, Kiffer CRV, Barth AL, Carneiro IC d. RS, Giamberardino HIG, et al. Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. *J Hosp Infect*. 2017;96(2):139–44.
20. Alp E, Damani N. Healthcare-associated infections in intensive care units: Epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(10):1040–5.
21. Rodríguez-Acelas AL, de Abreu Almeida M, Engelman B, Cañon-Montañez W. Risk factors for health care-associated infection in hospitalized adults: Systematic review and meta-analysis. *Am J Infect Control*. 2017;45(12):e149–56.
22. Guzmán-Herrador B, Molina CD, Allam MF, Navajas RFC. Independent risk factors associated with hospital-acquired pneumonia in an adult ICU: 4-year prospective cohort study in a university reference hospital. *J Public Heal (United Kingdom)*. 2016;38(2):378–83.
23. Chenoweth C, Saint S. Preventing Catheter-Associated Urinary Tract Infections in the Intensive Care Unit. *Crit Care Clin* [Internet]. 2013;29(1):19–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2012.10.005>
24. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em

25. Dyar OJ, Huttner B, Schouten J, Pulcini C. What is antimicrobial stewardship? *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2017;23(11):793–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.08.026>
26. Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008;197(8):1079–81.
27. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48(1):1–12.
28. De Angelis G, Fiori B, Menchinelli G, D’Inzeo T, Liotti FM, Morandotti GA, et al. Incidence and antimicrobial resistance trends in bloodstream infections caused by ESKAPE and *Escherichia coli* at a large teaching hospital in Rome, a 9-year analysis (2007–2015). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(9):1627–36.
29. Llaca-Díaz JM, Mendoza-Olazarán S, Camacho-Ortiz A, Flores S, Garza-González E. One-year surveillance of eskape pathogens in an intensive care unit of monterrey, Mexico. *Chemotherapy*. 2013;58(6):475–81.
30. De Socio GV, Rubbioni P, Botta D, Cenci E, Belati A, Paggi R, et al. Measurement and prediction of antimicrobial resistance in bloodstream infections by ESKAPE pathogens and *Escherichia coli*. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2019;19:154–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.05.013>
31. Katchanov J, Asar L, Klupp EM, Both A, Rothe C, König C, et al. Carbapenem-resistant Gram-negative pathogens in a German university medical center: Prevalence, clinical implications and the role of novel  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. *PLoS One*. 2018;13(4):1–14.

32. Eichenberger EM, Thaden JT. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant gram-negative bacteria. *Antibiotics*. 2019;8(37):1–21.
33. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(12):939–51.
34. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(3):538–82.
35. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med*. 2008;358(26):2845–7.
36. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;18(3):179–83.
37. Ibrahim ME. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia: Risk factors, antimicrobial resistance patterns and mechanisms of carbapenem resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2019;18(1):1–12.
38. Huang H, Chen B, Liu G, Ran J, Lian X, Huang X, et al. A multi-center study on the risk factors of infection caused by multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):11.
39. Zhou H, Yao Y, Zhu B, Ren D, Yang Q, Fu Y, et al. Risk factors for acquisition and mortality of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia: A retrospective study from a Chinese hospital. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(13):e14937.
40. 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 [Internet]*. 2012;15(4):237–47. Available from:

41. 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):1–17.
42. Hamidian M, Nigro SJ. Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Genomics*. 2019;5(10):1–13.
43. Cerezales M, Xanthopoulou K, Wille J, Bustamante Z, Seifert H, Gallego L, et al. *Acinetobacter baumannii* analysis by core genome multi-locus sequence typing in two hospitals in Bolivia: endemicity of international clone 7 isolates (CC25). *Int J Antimicrob Agents*. 2019;53(6):844–9.
44. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*. 2014;(6):25–64.
45. Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6:1–22.
46. Rice LB. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to  $\beta$ -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc [Internet]*. 2012;87(2):198–208. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.12.003>
47. Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, Aarestrup FM. World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies for the Use of Antimicrobials in Food Production Animals. *Clin Infect Dis*. 2009;49(1):132–41.

48. Lin J, Nishino K, Roberts MC, Tolmasky M, Aminov RI, Zhang L. Mechanisms of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2015;6(February):2013–5.
49. Codjoe F, Donkor E. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci.* 2017;6(1):1.
50. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):4943–60.
51. Antão EM, Vincze S, Hanke R, Klimmek L, Suchecka K, Lübke-Becker A, et al. Antibiotic resistance, the 3As and the road ahead. *Gut Pathog.* 2018;10(1):1–9.
52. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):1–61.
53. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(3):1–49.
54. Lupo A, Haenni M, Madec J-Y. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiol Spectr.* 2018;6(3):1–16.
55. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2009;65(2):233–8.
56. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm! *Trends Mol Med [Internet].* 2012;18(5):263–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>
57. Cerqueira GM, Peleg AY. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB Life.* 2011;63(12):1055–60.



58. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(Suppl. 1):29–36.
59. Ambler R P. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Phil Trans R Soc Lond.* 1980;289:153–78.
60. 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):1211–33.
61. Bertoncheli CDM, Hörner R. Uma revisão sobre metalo- $\beta$ -lactamases. *Brazilian J Pharm Sci.* 2008;44(4):577–99.
62. Livermore DM. B-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):557–84.
63. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969–76.
64. Bush K, Bradford PA. Interplay between  $\beta$ -lactamases and new  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019;17(5):295–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0159-8>
65. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-sanchez A, Biddle JW, Steward CD. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *S. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1151–61.
66. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1354–7.

67. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended- spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3):622–32.
68. 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):3579–81.
69. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile  $\beta$ -lactamases. Vol. 20, *Clinical Microbiology Reviews*. 2007. p. 440–58.
70. Bush K.  $\beta$ -Lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin Microbiol Rev*. 1988;1(1):109–23.
71. Mendes RE, Castanheira M, Campos Pignatari AC, Gales AC. Metallo- $\beta$ -lactamases. *J Bras Patol e Med Lab*. 2006;42(2):103–13.
72. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(5):673–9.
73. Gales AC, Tognim MCB, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;45(1):77–9.
74. Cayô R, Rodrigues-Costa F, Matos AP, Carvalhaes CG, Jové T, Gales AC. Identification of a new integron harboring blaIMP-10 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Vol. 59, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015. p. 3687–9.

75. Cayô R, Streling AP, Nodari CS, Matos AP, De Paula Luz A, Dijkshoorn L, et al. Occurrence of IMP-1 in non-baumannii *Acinetobacter* clinical isolates from Brazil. *J Med Microbiol.* 2018;67(5):628–30.
76. Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TPG, Carvalho-Assef APDA, et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(12):7592–4.
77. Brasiliense D, Cayô R, Streling AP, Nodari CS, Barata RR, Lemos PS, et al. Diversity of metallo- $\beta$ -lactamase-encoding genes found in distinct species of *acinetobacter* isolated from the brazilian amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019;114(4):1–6.
78. Chagas TPG, Carvalho-Assef APDA, Martins Aires CA, Bertocini R, Asensi MD. Detection of an NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* strain in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2015;3(2):147–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2015.03.005>
79. Pagano M, Poirel L, Martins AF, Rozales FP, Zavascki AP, Barth AL, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2015;45(4):444–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.12.011>
80. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases. Vol. 54, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010. p. 24–38.
81. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis.* 2019;69(Suppl 7):S521–8.
82. Evans BA, Amyes SGB. OXA  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev.*

2014;27(2):241–63.

83. Nowak P, Paluchowska P. *Acinetobacter baumannii*: Biology and drug resistance — role of carbapenemases. Vol. 54, *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2016. p. 61–74.
84. Carole Ayoub M, Halat DH. The Current Burden of Carbapenemases : Review of Significant Properties and Dissemination among. *Antibiotics*. 2020;9(186):1–34.
85. Bonnin A, Nordmann P, Poirel L. Critical Review Genetic Basis of Antibiotic Resistance in Pathogenic *Acinetobacter* Species. 2011;63(December):1061–7.
86. Brown S, Young HK, Amyes SGB. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2005;11(1):15–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01016.x>
87. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143 , a Novel Carbapenem-Hydrolyzing Class D  $\beta$ -Lactamase in *Acinetobacter baumannii* □. 2009;53(12):5035–8.
88. Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, De Araújo MRE, Lincopan N. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the blaOXA-143 gene in Brazilian hospitals. Vol. 55, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011. p. 1322–3.
89. Sarikhani Z, Nazari R, Nateghi Rostami M. First report of OXA-143-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in Qom, Iran. *Iran J Basic Med Sci*. 2017;20(11):1282–6.

90. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2121–6.
91. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1–8.
92. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: A century of challenges. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(1):409–47.
93. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2006;12(9):826–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x>
94. Normark BH SN. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med*. 2002;252(2):91–106.
95. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(9):711–21.
96. Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ. Conjugative plasmids: Vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2009;364(1527):2275–89.
97. Pagano M, Martins AF, Barth AL. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016;47(4):785–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.005>
98. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in

- Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett. 2006;258(1):72–7.
99. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol Rev. 2009;33:757–84.
  100. Amin M, Navidifar T, Shooshtari FS, Goodarzi H. Association of the genes encoding metallo- $\beta$ -lactamase with the presence of integrons among multidrug-resistant clinical isolates of *acinetobacter baumannii*. Infect Drug Resist. 2019;12:1171–80.
  101. Ramírez MS, Piñeiro S, Centrón D, Kaufman S, Kovensky J, Vay C, et al. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(2):699–706.
  102. Ramírez MS, Morales A, Vilacoba E, Márquez C, Centrón D. Class 2 integrons dissemination among multidrug resistance (MDR) clones of *acinetobacter baumannii*. Curr Microbiol. 2012;64(3):290–3.
  103. Fonseca ÉL, Freitas FDS, Scheidegger ÉMD, Jacinto T, Vicente ACP. Class 2 integrons in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in different Brazilian geographic regions. Int J Antimicrob Agents. 2011;38(1):95–6.
  104. Martins N, Picão RC, Adams-Sapper S, Riley LW, Moreira BM. Association of class 1 and 2 integrons with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones and *Acinetobacter nosocomialis* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(1):698–701.
  105. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. Vol. 56, Journal of Clinical Microbiology. 2018. p. 1–13.

106. Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: Increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Med J*. 2011;52(6):879–91.
107. Amjad A, Mirza IA, Abbasi SA, Farwa U, Malik N, Zia F. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iran J Microbiol*. 2011;3(4):189–93.
108. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother*. 2009;65(2):249–51.
109. Cordeiro-Moura JR, Fehlberg LCC, Nodari CS, Matos AP de, Alves V de O, Cayô R, et al. Performance of distinct phenotypic methods for carbapenemase detection: The influence of culture media. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;96(1):114912.
110. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):40–3.
111. K. Lee, Y. S. Lim, D. Yong, J. H. Yum and YC. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 2003;41(10):4623–35.
112. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2006;27:351–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1265908/>

113. Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- $\beta$ -lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection*. 2007;35(6):457–60.
114. Muthuirulandi Sethuvel D, Devanga Ragupathi N, Bakthavatchalam Y, Vijayakumar S, Varghese R, Shankar C, et al. Current strategy for local- to global-level molecular epidemiological characterisation of global antimicrobial resistance surveillance system pathogens. *Indian J Med Microbiol*. 2019;37(2):147–62.
115. Singh A, Goering R V., Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):512–30.
116. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(1):11–9.
117. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V., Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233–9.
118. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MAD, 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):4382–90.
119. Bogaty C, Mataseje L, Gray A, Lefebvre B, Lévesque S, Mulvey M, et al. Investigation of a Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* outbreak using whole genome sequencing versus a standard epidemiologic investigation. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7(1):1–7.



120. Fitzpatrick MA, Ozer EA, Hauser AR. Epidemiology and Analyzing Hospital Outbreaks. *J Clin Microbiol.* 2016;54(3):593–612.
121. CLSI, Dolinsky AL, Ohiro RK, Fan W, Xiao C, Wu F. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S10. *J Int Med Res* [Internet]. 2017;46(September):18. Available from: <http://www.epa.gov/nerlcwww/1604sp02.pdf><http://www.emeraldinsight.com/doi/10.1108/08876049410065598>[https://clsi.org/media/1469/m100s27\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1469/m100s27_sample.pdf)[http://shop.clsi.org/site/Sample\\_pdf/M100S27\\_sample.pdf](http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M100S27_sample.pdf)
122. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7(2):88–91.
123. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007;23(10):1289–91.
124. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):1–12.
125. Nemeč A, Křížová L, Maixnerová M, Diancourt L, Van der Reijden TJK, Brisse S, et al. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(3):484–9.
126. Savage RD, Fowler RA, Rishu AH, Bagshaw SM, Cook D, Dodek P, et al. Pathogens and antimicrobial susceptibility profiles in critically ill patients with bloodstream infections: a descriptive study. *C Open.* 2016;4(4):E569–77.
127. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et

- al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2012;18(3):268–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
128. Russo PL, Stewardson AJ, Cheng AC, Bucknall T, Mitchell BG. The prevalence of healthcare associated infections among adult inpatients at nineteen large Australian acute-care public hospitals: A point prevalence survey. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):1–8.
129. WHO. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report. Geneva, World Health Organization. Who. 2017. 268 p.
130. Nogueira Junior C, de Mello DS, Padoveze MC, Boszczowski I, Levin AS, Lacerda RA. Caracterização dos sistemas de vigilância epidemiológica das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no mundo e desafios para o Brasil. Vol. 30, *Cadernos de Saude Publica*. 2014. p. 11–20.
131. Da Silva KE, Maciel WG, Croda J, Cayô R, Ramos AC, De Sales RO, et al. A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit. *PLoS One*. 2018;13(12):1–11.
132. Ferreira E, Pina E, Sousa-Uva M, Sousa-Uva A. Risk factors for health care-associated infections: From better knowledge to better prevention. *Am J Infect Control*. 2017;45(10):e103–7.
133. Guimarães AC, Donalizio MR, Santiago THR, Freire JB. Mortality associated with nosocomial infection, occurring in a general hospital of Sumaré-SP, Brazil. *Rev Bras Enferm*. 2011;64(5):864–9.
134. Souza ES, Belei RA, Carrilho CMD de M, Matsuo T, Yamada-Ogatta SF,

Andrade G, et al. Mortalidade e riscos associados a infecção relacionada à assistência à saúde. *Texto e Context Enferm*. 2015;24(1):220–8.

135. BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Atenção Integral à Saúde do Homem. Ministério da Saúde Brasília; 2008 p. 40.
136. Zhao X, Wang L, Wei N, Zhang J, Ma W, Zhao H, et al. Epidemiological and clinical characteristics of healthcare-associated infection in elderly patients in a large Chinese tertiary hospital: A 3-year surveillance study. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):1–7.
137. Zhao X, Wang L, Wei N, Zhang J, Ma W, Zhao H, et al. Risk factors of health care-associated infection in elderly patients: A retrospective cohort study performed at a tertiary hospital in China. *BMC Geriatr*. 2019;19(1):1–6.
138. Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: Analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1866–71.
139. de Oliveira AC, Kovner CT, da Silva RS. Infecção hospitalar em unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário brasileiro. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2010;18(2):233–9.
140. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2014;78(4):443–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.025>
141. Lob SH, Biedenbach DJ, Badal RE, Kazmierczak KM, Sahm DF. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* Antimicrobial resistance and resistance

mechanisms of Enterobacteriaceae in ICU and non-ICU wards in Europe and North America : SMART 2011 – 2013. 2015;3:190–7.

142. Arefian H, Hagel S, Fischer D, Scherag A, Brunkhorst FM, Maschmann J, et al. Estimating extra length of stay due to healthcare-associated infections before and after implementation of a hospital-wide infection control program. *PLoS One*. 2019;14(5):1–11.
143. de Azevedo FKSF, Dutra V, Nakazato L, Mello CM, Pepato MA, de Sousa ATHI, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant acinetobacter baumannii infection in two hospitals in central brazil: The role of st730 and st162 in clinical outcomes. *J Med Microbiol*. 2019;68(1):31–40.
144. Zhou Q, Fan L, Lai X, Tan L, Zhang X. Estimating extra length of stay and risk factors of mortality attributable to healthcare-associated infection at a Chinese university hospital: A multi-state model. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1–7.
145. Sahu M, Siddharth B, Choudhury A, Vishnubhatla S, Singh S, Menon R, et al. Incidence, microbiological profile of nosocomial infections, and their antibiotic resistance patterns in a high volume Cardiac Surgical Intensive Care Unit. *Ann Card Anaesth*. 2016;19(2):281–7.
146. Abubakar U. Antibiotic use among hospitalized patients in northern Nigeria: a multicenter point-prevalence survey. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):86.
147. Henig O, Weber G, Hoshen MB, Paul M, German L, Neuberger A, et al. Risk factors for and impact of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: matched case–control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(10):2063–8.
148. Alecrim RX, Taminato M, Belasco A, Longo MCB, Kusahara DM, Fram D. Strategies for preventing ventilator-associated pneumonia: an integrative review.

Rev Bras Enferm. 2019;72(2):521–30.

149. Institute for Healthcare Improvement. How-to Guide: Prevent Ventilator-Associated Pneumonia. Cambridge, MA. 2012.
150. Frota ML, Campanharo CRV, Lopes MCBT, Piacezzi LHV, Okuno MFP, Batista REA. Good practices for preventing ventilator-associated pneumonia in the emergency department. Rev da Esc Enferm da USP. 2019;53:e0460.
151. Marini AL, Khan R, Mundekadan S. Multifaceted bundle interventions shown effective in reducing VAP rates in our multidisciplinary ICUs. BMJ Qual Improv Reports. 2016;5(1):u205566.w2278.
152. Sánchez-López J, Cantón R. Current status of ESKAPE microorganisms in Spain: Epidemiology and resistance phenotypes. Vol. 32, Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia. 2019. p. 27–31.
153. Canet M, Erdmenger D, Perez W. ESKAPE pathogens resistance from blood cultures in a social security reference hospital in Guatemala. Int J Infect Dis [Internet]. 2018;73(2018):130. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.3710>
154. Marturano JE, Lowery TJ. ESKAPE pathogens in bloodstream infections are associated with higher cost and mortality but can be predicted using diagnoses upon admission. Open Forum Infect Dis. 2019;6(12):1–8.
155. Karlowsky JA, Hoban DJ, Hackel MA, Lob SH, Sahm DF. Resistance among Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Latin American countries: SMART 2013–2015. Brazilian J Infect Dis. 2017;21(3):343–8.

156. 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* [Internet]. 2012;73(4):354–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>
157. Costa DM, Johani K, Melo DS, Lopes LKO, Lopes Lima LKO, Tipple AFV, et al. Biofilm contamination of high-touched surfaces in intensive care units: epidemiology and potential impacts. *Lett Appl Microbiol*. 2019;68(4):269–76.
158. Ribeiro PCS, Monteiro AS, Marques SG, Monteiro SG, Monteiro-Neto V, Coqueiro MMM, et al. Phenotypic and molecular detection of the bla KPC gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2016;16(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-2072-3>
159. BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016 [Internet]. Vol. 16, ANVISA - Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. 2016. Available from: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-de-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-n-13-avaliacao-dos-indicadores-nacionais-das-infeccoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude-iras-e-resistencia-micro>
160. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):318–27.
161. World Health Organization. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial

- infections, including tuberculosis [Internet]. Essential medicines and health products. 2017. Available from: [https://www.who.int/medicines/areas/rational\\_use/antibacterial\\_agents\\_clinical\\_development/en/](https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/antibacterial_agents_clinical_development/en/)[http://www.who.int/medicines/areas/rational\\_use/PPLreport\\_2017\\_09\\_19.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf?ua=1)[http://www.who.int/medicines/areas/rational\\_use/prioritization-of-pathogens/en](http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/prioritization-of-pathogens/en)
162. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front Microbiol.* 2019;10(April):1–24.
  163. Wałaszek M, Kosiarska A, Gniadek A, Kołpa M, Wolak Z, Dobroś W, et al. The risk factors for hospital-acquired pneumonia in the Intensive Care Unit. *Przegląd Epidemiol.* 2016;70(1):15–20.
  164. Castilho SRA, Godoy CSDM, Guilarde AO, Cardoso JL, André MCP, Junqueira-Kipnis AP, et al. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. *PLoS One.* 2017;12(5):1–13.
  165. Lorenzin G, Scaltriti E, Gargiulo F, Caccuri F, Piccinelli G, Gurrieri F, et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units in northern Italy: A genomic approach to characterize new sequence types. *Future Microbiol.* 2019;14(15):1281–92.
  166. Lei J, Han S, Wu W, Wang X, Xu J, Han L. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak cross-transmitted in an intensive care unit and respiratory intensive care unit. *Am J Infect Control.* 2016;44(11):1280–4.
  167. Rocha IV, Xavier DE, Almeida KRH de, Oliveira SR de, Leal NC. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clones persist on hospital inanimate surfaces. *Brazilian J Infect Dis.* 2018;22(5):438–41.

168. Lob SH, Hoban DJ, Sahm DF, Badal RE. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2016;47(4):317–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.01.015>
169. Rodríguez CH, Nastro M, Famiglietti A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2018;50(3):327–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.006>
170. 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):583–8.
171. Nowak J, Zander E, Stefanik D, Higgins PG, Roca I, Vila J, et al. High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(12):3277–82.
172. Asadian M, Azimi L, Alinejad F, Ostadi Y, Lari A. Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Ventilator-Associated Pneumonia and Burn Wound Colonization by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction and the Relationship between Antibiotic Susceptibility and Biofil. *Adv Biomed Res*. 2019;8(1):58.
173. Meshkat Z, Amini Y, Sadeghian H, Salimizand H. ISAba1/bla OXA-23-like family is the predominant cause of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Iran. *Infect Genet Evol*. 2019;71(September 2018):60–6.
174. Gao L, Lyu Y, Li Y. Trends in drug resistance of *Acinetobacter baumannii* over a



10-year period: Nationwide data from the China surveillance of antimicrobial resistance program. *Chin Med J (Engl)*. 2017;130(6):659–64.

175. Chen FJ, Huang WC, Liao YC, Wang HY, Lai JF, Kuo SC, et al. Molecular epidemiology of emerging carbapenem resistance in *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii* in Taiwan, 2010 to 2014. Vol. 63, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019. p. 1–10.
176. Kanj SS, Whitelaw A, Dowzicky MJ. In vitro activity of tigecycline and comparators against Gram-positive and Gram-negative isolates collected from the Middle East and Africa between 2004 and 2011. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2014;43(2):170–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.10.011>
177. Ssekatawa K, Byarugaba DK, Wampande E, Ejobi F. A systematic review: The current status of carbapenem resistance in East Africa [Internet]. Vol. 11, *BMC Research Notes*. BioMed Central; 2018. p. 1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3738-2>
178. Mhondoro M, Ndlovu N, Bangure D, Juru T, Gombe NT, Shambira G, et al. Trends in antimicrobial resistance of bacterial pathogens in Harare, Zimbabwe, 2012-2017: A secondary dataset analysis. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1–9.
179. Levy-Blitchtein S, Roca I, Plasencia-Rebata S, Vicente-Taboada W, Velásquez-Pomar J, Muñoz L, et al. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru article. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2018;7(119):2–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0127-9>
180. Opazo-Capurro A, San Martín I, Quezada-Aguiluz M, Morales-León F, Domínguez-Yévenes M, Lima CA, et al. Evolutionary dynamics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in Chilean hospitals. *Infect Genet*

Evol. 2019;73(November 2018):93–7.

181. H. Rodríguez C, Nastro M, A. Flores S, Rodriguez M, Spinozzi M, Bruni G, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2019;51(3):247–50.
182. Royer S, Amaral de Campos P, Araújo BF, Ferreira ML, Gonçalves IR, William da Fonseca Batistão D, et al. Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial blaOXA-23 producing XDR *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One.* 2018;13(6):1–14.
183. Tavares LCB, De Vasconcellos FM, De Sousa WV, Rocchetti TT, Mondelli AL, Ferreira AM, et al. Emergence and persistence of high-risk clones among MDR and XDR *A. baumannii* at a Brazilian teaching hospital. *Front Microbiol.* 2019;9(January):1–12.
184. Brink AJ. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32:609–16.
185. Gales AC, Seifert H, Gur D, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial Susceptibility of *acinetobacter calcoaceticus-acinetobacter baumannii* complex and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(Suppl 1):S34–46.
186. Girardello R, Gales AC. Resistência às Polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. *Rev Epidemiol e Control Infecção.* 2012;2(2):66.
187. Provasi Cardoso J, Cayô R, Girardello R, Gales AC. Diversity of mechanisms conferring resistance to  $\beta$ -lactams among OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clones. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;85(1):90–7.

188. Lima WG, Silva Alves GC, Sanches C, Antunes Fernandes SO, de Paiva MC. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in patients with burn injury: A systematic review and meta-analysis. *Burns* [Internet]. 2019;45(7):1495–508. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.07.006>
189. Ko KS, Suh JY, Kwon KT, Jung SI, Park KH, Kang CI, et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(5):1163–7.
190. Rodrigues-Costa F, Cayô R, Matos AP, Girardello R, Martins WMBS, Carrara-Marroni FE, et al. Temporal evolution of *Acinetobacter baumannii* ST107 clone: conversion of bla OXA-143 into bla OXA-231 coupled with mobilization of ISAbal1 upstream occAB1. *Res Microbiol*. 2019;170(1):53–9.
191. Vasconcelos ATR, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucarevski BR, et al. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: A BrasNet report. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2015;83(4):382–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.08.006>
192. Long W, Yuan J, Liu J, Liu J, Wu M, Chen X, et al. Multidrug Resistant Brain Abscess Due to *Acinetobacter baumannii* Ventriculitis Cleared by Intraventricular and Intravenous Tigecycline Therapy: A Case Report and Review of Literature. *Front Neurol*. 2018;9(June):1–7.
193. Graña-Miraglia L, Evans BA, López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Volkow-Fernández P, et al. Origin of OXA-23 Variant OXA-239 from a Recently Emerged Lineage of *Acinetobacter baumannii* International Clone V. *mSphere*. 2020;5(1):1–9.
194. Martins N, Dalla-Costa L, Uehara AA, Riley LW, Moreira BM. Emergence of *Acinetobacter baumannii* international clone II in Brazil: Reflection of a global

expansion. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2013;20:378–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.09.028>

195. Martins N, Martins IS, Freitas WV, Matos JA, Girão VBC, 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(3):216–23.
196. Chagas TPG, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef APDA, 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):468–72.
197. Vasconcellos FM de, Tiba-Casas MR, Tavares LCB, Souza WV de, Garcia D de O, Camargo CH. Evaluation of a new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clonal complexes circulating in Brazil. *Infect Genet Evol*. 2017;54:4–6.
198. Moreira MG, Camargo CH, Vasconcellos FM, Barreto LM, Nobre V, Santos SG. Diversity of bla OXA-51 variants and its clonal complexes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in patients with ventilator-associated pneumonia. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;9:94–5.
199. Maciel WG, da Silva KE, Croda J, Cayô R, Ramos AC, de Sales RO, et al. Clonal spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2018;98(3):300–4.
200. Schimith Bier KE, Luiz SO, Scheffer MC, Gales AC, Paganini MC, do Nascimento AJ, et al. Temporal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Curitiba, southern Brazil. *Am J Infect Control*. 2010;38(4):308–14.
201. Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef APDA, Asensi

- MD, et al. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: A new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(1):62–5.
202. Coelho-souza T, Reis JN, Martins N, Martins IS, Paula A, Menezes O, et al. Longitudinal surveillance for meningitis by *Acinetobacter* in a large urban setting in Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(5):241–4.
203. Camargo CH, Tiba MR, Saes MR, De Vasconcellos FM, Dos Santos LF, Romero EC, et al. Population structure analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Brazil reveals predominance of clonal complexes 1, 15, and 79. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(4):2545–7.
204. Pagano M, Nunes LS, Niada M, Barth AL, Martins AF. Comparative Analysis of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Sequence Types in Southern Brazil: From the First Outbreak (2007–2008) to the Endemic Period (2013–2014). *Microb Drug Resist.* 2019;25(4):538–42.
205. 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(1):294–301.
206. Rodríguez CH, Balderrama Yarhui N, Nastro M, Nuñez Quezada T, Castro Cañarte G, Ventura RM, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Med Microbiol.* 2016;65(10):1088–91.
207. Cieslinski JM, Arend L, Tuon FF, Silva EP, Ekermann RGS, Dalla-Costa LM, et al. Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence-based PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis [Internet].* 2013;77(4):337–40. Available from:

208. Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, Di Popolo A, Bernardo M, Tomasone F, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1223–30.
209. Mayanskiy N, Chebotar I, Alyabieva N, Kryzhanovskaya O, Savinova T, Turenok A, et al. Emergence of the Uncommon Clone ST944/ST78 Carrying blaOXA-40-like and blaCTX-M-like Genes Among Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in Moscow, Russia. *Microb Drug Resist.* 2017;23(7):864–70.
210. Pournaras S, Dafopoulou K, Del Franco M, Zarkotou O, Dimitroulia E, Protonotariou E, et al. Predominance of international clone 2 OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece, 2015: results of a nationwide study. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(6):749–53.
211. Pfeifer Y, Hunfeld KP, Borgmann S, Maneg D, Blobner W, Werner G, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST78 with OXA-72 carbapenemase and ESBL gene blaCTX-M-115. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(5):1426–32.
212. Vali L, Dashti K, Opazo-Capurro AF, Dashti AA, Al Obaid K, Evans BA. Diversity of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* population in a major hospital in Kuwait. *Front Microbiol.* 2015;6(July):1–8.
213. Munoz-Price LS, Arheart K, Nordmann P, Boulanger AE, Cleary T, Alvarez R, et al. Eighteen years of experience with *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital\*. *Crit Care Med.* 2013;41(12):2733–42.
214. Mahamat A, Bertrand X, Moreau B, Hommel D, Couppie P, Simonnet C, et al.

- Clinical epidemiology and resistance mechanisms of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, French Guiana, 2008–2014. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(1):51–5.
215. Medeiros M, Lincopan N. Oxacillinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: Clinical and environmental impact and therapeutic options. *J Bras Patol e Med Lab*. 2013;49(6):391–405.
216. Turano H, Gomes F, Medeiros M, Oliveira S, Fontes LC, Sato MIZ, et al. Presence of high-risk clones of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* (ST79) and SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* (ST277) in environmental water samples in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;86(1):80–2.
217. Dalla-Costa LM et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003;41(7):3403–6.
218. Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: Dissemination in Southern Brazil. Vol. 37, *Infection*. 2009. p. 474–6.
219. 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):452–4.
220. 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):5035–8.
221. Gonzalez-Villoria AM, Valverde-Garduno V. Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial

Pathogen. J Pathog. 2016;2016:1–10.

222. Brasiliense DM, Lima KVB, Pérez-Chaparro PJ, Mamizuka EM, de Oliveira Souza C, Dutra LMG, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter pittii* carrying the blaOXA-72 gene in the Amazon region, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;93(1):82–4.
223. De Sá Cavalcanti FL, Almeida ACS, Vilela MA, de Moraes Junior MA, De Moraes MMC, Leal-Balbino TC. Emergence of extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: Risk of clonal dissemination? *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2013;77(3):250–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.022>
224. Pagano M, Rozales FP, Bertolini D, Rocha L, Sampaio JL, Barth AL, et al. Emergence of *Acinetobacter baumannii* ST730 carrying the bla<sub>oxa</sub>-72 gene in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(9):597–8.
225. Bierwirth J, Schulz-Stübner S. Subjective qualitative hand hygiene compliance observation: A feasibility trial. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017;38(2):251–2.
226. D'Andrea MM, Giani T, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P, et al. Characterization of pABVA01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3528–33.
227. Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, et al. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(6):2724–7.
228. Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain.



Emerg Infect Dis. 2011;17(6):1064–7.

229. Fernández-Cuenca F, Rodríguez-Martínez JM, Gómez-Sánchez MC, De Alba PD, Infante-Martínez V, Pascual Á. Production of a plasmid-encoded OXA-72  $\beta$ -lactamase associated with resistance to carbapenems in a clinical isolate *Acinetobacter junii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(1):93–4.
230. Grosso F, Quinteira S, Poirel L, Novais Â, Peixe L. Role of common bla OXA-24/OXA-40-carrying platforms and plasmids in the spread of OXA-24/OXA-40 among *Acinetobacter* species clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(7):3969–72.
231. Kuo HY, Hsu PJ, Chen JY, Liao PC, Lu CW, Chen CH, et al. Clonal spread of blaOXA-72-carrying *Acinetobacter baumannii* sequence type 512 in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(1):111–3.
232. Povilonis J, Šeputiene V, Krasauskas R, Juškaite R, Miškinyte M, Sužiedelis K, et al. Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(5):1000–6.
233. Founou RC, Founou LL, Essack SY. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(12):1–18.
234. Thorne A, Luo T, Durairajan NK, Kaye KS, Fozman B. Risk factors for endemic *Acinetobacter Baumannii* colonization: A case–case study. *Am J Infect Control*. 2019;47(11):1294–7.

## 9 APÊNDICES

# APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ORIGINAL ARTICLE

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 114: e190232, 2019 1 | 4

## *Acinetobacter baumannii* infections in Amazon Region driven by extensively drug resistant international clones, 2016-2018

Raquel Vosges Caldart<sup>1</sup>, Erica L Fonseca<sup>2/+</sup>, Fernanda Freitas<sup>2</sup>, Luiza Rocha<sup>3</sup>, Ana Carolina Vicente<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, RR, Brasil

<sup>2</sup>Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima, Boa Vista, RR, Brasil

**BACKGROUND** *Acinetobacter baumannii* is a leading cause of nosocomial infections. This species is characterised by the presence of pandemic lineages (International Clones) that present a broad antimicrobial resistance profile.

**OBJECTIVE** To perform the molecular epidemiology of carbapenem-resistant *A. baumannii* from a clinical setting in the Amazon Basin, and to characterise their antimicrobial resistance determinants.

**METHODS** The genetic relationship of carbapenem-resistant *A. baumannii* were assessed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). Class A, B and D  $\beta$ -lactamase genes were screened by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. The antimicrobial susceptibility profile was obtained by Disc-diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) determination.

**FINDINGS** All carbapenem-resistant *A. baumannii* strains belonged to three international clones, IC-1, IC-5 and IC-6, the latter recently reported by the first time in Brazil. The major determinant of carbapenem resistance in IC-1 and IC-5 strains was *bla*<sub>OXA-23</sub>, associated with *ISAbal* and *ISAbas3*, respectively, while IC-6 harboured the *bla*<sub>OXA-72</sub>.

**CONCLUSIONS** The *A. baumannii* epidemiology in Brazilian Amazon Region was unknown. It was demonstrated that *A. baumannii* XDR international clones were responsible for nosocomial infections in Boa Vista during 2016-2018, revealing that the epidemiological scenario of *A. baumannii* infections in Amazon Region resembles those from the cosmopolitan regions worldwide.

Key words: international clone - extensively drug resistance - *Acinetobacter baumannii* - Amazon Region - *bla*<sub>OXA-23</sub>

*Acinetobacter baumannii* has emerged in recent years as a leading cause of nosocomial infections associated with a longer hospital stay and higher mortality, representing a public health problem of major concern worldwide.<sup>(1)</sup> *A. baumannii* presents the long-term ability to survive on inanimate surfaces, and this persistence seems to contribute to its person-to-person transmission, intra- and inter-hospital outbreak spread, and national and international clonal dissemination.<sup>(2)</sup> Additionally, this species is characterised by remarkable capabilities for the acquisition of antibiotic resistance genes (ARGs).<sup>(3)</sup> High-risk pandemic lineages, named international clones (ICs), presenting high capacity to persist in clinical environments and a broad antimicrobial resistance profile have been associated with outbreaks in several cosmopolitan regions around the world.<sup>(4,5)</sup>

Carbapenem resistance is a major therapeutic concern in *Acinetobacter* and it is usually mediated by carbapenem-hydrolysing class D  $\beta$ -lactamase (CHDL) from

OXA Family, such as *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-143</sub> and *bla*<sub>OXA-235</sub>.<sup>(1,6,7)</sup> In Brazil, the carbapenem resistance rates are around 80.7%<sup>(8)</sup> as a consequence of *bla*<sub>OXA-23</sub> dissemination by some pandemic lineages, such as those from CC15, CC79 and CC1 (international clone IC-1).<sup>(9,10,11)</sup> The *bla*<sub>OXA-23</sub> is frequently found downstream the *ISAbal* sequence, which accounts for its mobilisation and supports its overexpression due to the presence of a strong promoter.<sup>(1,6,12)</sup>

The epidemiology of clinical *A. baumannii* and its antibiotic resistance determinants are concentrated in densely populated cosmopolitan cities from the South and Southeast Brazilian regions.<sup>(8,10,13)</sup> Considering that Brazil is a country with continental dimensions and with contrasting demographical features, it is crucial to gain insights about the epidemiological scenario and the dynamics of carbapenem resistance in other geographical regions outside these cosmopolitan sites.

This study aimed to determine the molecular epidemiology of carbapenem-resistant *A. baumannii* strains from a clinical setting of the North region, and to characterise their carbapenem resistance determinants.

### MATERIALS AND METHODS

*Clinical data, bacterial strains and antimicrobial susceptibility test* - The General Hospital of Roraima (GHR), placed in Boa Vista, is a 281-bed tertiary health-care medical unit, the largest in Roraima, which includes general wards, two intensive care units (ICUs) with 10 beds each, surgical centre and emergency.

doi: 10.1590/0074-02760190232

Financial support: CNPq, Instituto Oswaldo Cruz (grant).

+ Corresponding author: ericafon@ioc.fiocruz.br

● <https://orcid.org/0000-0002-5029-7389>

Received 04 July 2019

Accepted 06 November 2019



online | [memorias.ioc.fiocruz.br](http://memorias.ioc.fiocruz.br)

From October, 2016 to May, 2018, 101 *A. baumannii* isolates were recovered from nosocomial infections cases of non-repetitive inpatients. From 101 isolates, 27 were resistant to carbapenem and these strains were characterised as described below (Table). Species identification was performed with the automated VITEK2, and confirmed by sequencing the 16S rRNA and the *bla*<sub>OXA-51</sub> genes.

The antibiotic susceptibility profile was determined by disc-diffusion method according to clinical and laboratory standards institute (CLSI) guidelines,<sup>(14)</sup> for the following antibiotics: gentamicin, amikacin, tobramycin, imipenem, meropenem, doripenem, ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanic acid, cefotaxime, ceftazidime, cefepime,

trimethoprim/sulphamethoxazole, tetracycline and minocycline. The minimum inhibitory concentration (MIC) of polymyxin B was assessed by the broth micro-dilution with antibiotic concentrations ranged from 0.1 µg/mL to 64 µg/mL. The current definition criteria for classifying *A. baumannii* antimicrobial resistance was applied.<sup>(15)</sup> The carbapenemase production was assessed by the modified Hodge Test.<sup>(16)</sup>

*Genotyping by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST)* - The clonal relationship among the carbapenem-resistant *A. baumannii* strains was established by the *in situ* lysis technique, in agarose blocks as described previously and digested with 30U ApaI restriction enzyme. PFGE banding

TABLE  
Epidemiological, phenotypic and genotypic features of the XDR *Acinetobacter baumannii* international clones found in General Hospital of Roraima, Boa Vista

Strains	Isolation date	PFGE	MLST (IC)	Ward	Clinical specimen	Carbapenemase activity	IS <i>Aba</i> - <i>bla</i> <sub>OXA</sub>
AB4332	Oct/16/16	B	ST78 (IC-6)	ICU	Tracheal secretion	+	OXA-72
AB4353	Oct/21/16	A	ST79 (IC-5)	ICU	Catheter tip	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB5262	Dec/21/16	B	ST78 (IC-6)	ICU	Catheter tip	+	OXA-72
AB5375	Dec/29/16	B	ST78 (IC-6)	Traumatology	Tracheal secretion	+	OXA-72
AB49	Jan/03/17	C	ST1 (IC-1)	ICU	Catheter tip	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB77	Jan/05/17	A	ST79 (IC-5)	others hospital wards	Wound secretion	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB715	Feb/12/17	A	ST79 (IC-5)	Emergency	Bronchial aspirate	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB1077	Mar/08/17	A	ST79 (IC-5)	ICU	Tracheal secretion	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB1113	Mar/08/17	A	ST79 (IC-5)	ICU	Cerebrospinal fluid	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB283	Apr/25/17	C	ST1 (IC-1)	ICU	Tracheal secretion	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB08	Aug/31/17	B	ST78 (IC-6)	ICU	Blood	+	OXA-72
AB65	Sep/26/17	C	ST1 (IC-1)	others hospital wards	Bone tissue	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB81	Oct/02/17	A1	ST79 (IC-5)	ICU	Tracheal secretion	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB04-RR5	Jan/01/18	A1	ST79 (IC-5)	ICU	Blood	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB07-RR5	Jan/14/18	C	ST1 (IC-1)	others hospital wards	Blood	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB28-RR5	Jan/17/18	A	ST79 (IC-5)	ICU	Tracheal secretion	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB37-RR5	Jan/19/18	A	ST79 (IC-5)	ICU	Tracheal secretion	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB40-RR5	Jan/19/18	C	ST1 (IC-1)	ICU	Tracheal secretion	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB39-RR5	Jan/21/18	C	ST1 (IC-1)	ICU	Tracheal secretion	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB51-RR5	Jan/26/18	A	ST79 (IC-5)	ICU	Tracheal secretion	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB07-RR6	Apr/23/18	C	ST1 (IC-1)	others hospital wards	Wound secretion	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB04-RR6	Apr/25/18	A	ST79 (IC-5)	ICU	Catheter tip	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB06-RR6	Apr/26/18	C	ST1 (IC-1)	ICU	Hepatic abscess	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB01-RR6	Apr/29/18	B	ST78 (IC-6)	ICU	Catheter tip	+	OXA-72
AB05-RR6	Apr/29/18	A	ST79 (IC-5)	others hospital wards	Catheter tip	+	IS <i>Aba</i> 3-OXA-23
AB02-RR6	May/03/18	C	ST1 (IC-1)	Emergency	Tracheal secretion	+	IS <i>Aba</i> 1-OXA-23
AB03-RR6	May/15/18	B	ST78 (IC-6)	ICU	Tracheal secretion	+	OXA-72

ICU: intensive care unit; MLST (IC): multilocus sequence typing (international clone); PFGE: pulsed-field gel electrophoresis.



patterns were analysed and compared visually. Isolates were considered to be clonal when the macrorestriction DNA patterns differed by fewer than three bands.<sup>(17)</sup>

The MLST was performed using the Oxford an Pasteur schemes (<https://pubmlst.org/abaumannii/>) available in the *A. baumannii* MLST website (<https://pubmlst.org/abaumannii/>).<sup>(4,18)</sup> Clonal complexes (CCs) were considered when sequence types (STs) shared five or more identical alleles taking into account the seven genes that are considered in the MLST schemes.<sup>(5)</sup>

**Detection of carbapenem resistance genes by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing** - The presence of genes encoding class A (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>B-KC</sub>), class B (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>SIM-1</sub>, and *bla*<sub>NDM-1</sub>), and class D (*bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-143-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub>, and *bla*<sub>OXA-51-like</sub>) β-lactamases with carbapenemase activity was detected by PCR and sequencing in the carbapenem-resistant isolates as previously described.<sup>(19,20,21,22,23,24)</sup>

The presence of the *ISAbal* upstream the *bla*<sub>OXA</sub> genes was also investigated.<sup>(25)</sup>

## RESULTS AND DISCUSSION

The phenotypic analysis revealed that all carbapenem-resistant strains (n = 27) presented the XDR phenotype, since they were susceptible only to polymixin B, minocycline and tetracycline (Table). All strains were positive for the Modified Hodge Test, indicating carbapenemase production.

PFGE and MLST analyses demonstrated the concomitant occurrence of three XDR lineages in HGR from 2016 to 2018. The ST1<sup>PAS</sup>/ST109<sup>OXF</sup> (Clone C; n = 9), ST79<sup>PAS</sup>/ST758<sup>OXF</sup> (Clone A; n = 12) and ST78<sup>PAS</sup>/ST944<sup>OXF</sup> (Clone B; n = 6), corresponded to the high-risk pandemic International Clone I (IC-1), International Clone V (IC-5) and International Clone VI (IC-6), respectively (Table).<sup>(20,26,27,28,29)</sup> Previous studies had already reported the dissemination and the high prevalence of multidrug resistant *A. baumannii* from CC1 (ST1/IC-1), CC15 (ST180) and CC79 (ST79/IC-5) in Brazil.<sup>(9,10,11)</sup> Here, it was demonstrated that CC1 and CC79 are also prevalent in a clinical setting from the Amazon Region (Table). Interestingly, considering Brazil, the IC-6 seems to be restricted, so far, to this clinical setting in the Amazon Region,<sup>(29)</sup> although it has been involved with outbreaks worldwide since 2006.<sup>(5,30)</sup> These findings stress the spatial temporal persistence and dissemination potential of these three pandemic lineages, since they also occurred in the Brazilian Amazon Region, at least, during 2016-2018.

The *bla*<sub>OXA-23</sub> in association with *ISAbal* sequences, is one of the most widespread CHDL among *A. baumannii* in Brazil, and it has been disseminated in the country by the high-risk pandemic lineages from CC1 (IC-1), CC79 (IC-5) and CC15. However, most of these studies focused on clinical settings placed in the Southeast and South regions of Brazil.<sup>(2,9,10,11,26)</sup> Similarly, we verified that *bla*<sub>OXA-23</sub> was also the most prevalent carbapenemase gene among IC-1 and IC-5 XDR *A. baumannii* from Boa Vista (Table), and that it was found downstream *ISAbal* and

*ISAbal3*, explaining the observed carbapenem resistance in IC-1 and IC-5 strains, respectively. Instead, the IC-6 strains carried the carbapenemase *bla*<sub>OXA-72</sub> gene flanked by XerC/XerD binding sites.<sup>(29)</sup> However, in spite of that, it was previously demonstrated that, even in the absence of *ISAbal* sequences, *bla*<sub>OXA-72</sub> had contributed to the carbapenem resistance.<sup>(29,31)</sup>

**In conclusion** - This study unraveled, by the first time, the epidemiological context of *A. baumannii* infections in a city from the Amazon Region. This scenario resembled that observed in cosmopolitan regions around the world, since it was verified that the nosocomial infections that occurred in Boa Vista from 2016 to 2018 was concomitantly caused by three XDR international clones, IC-1, IC-5 and IC-6, the latter only recently reported in Brazil (more precisely, in Boa Vista city). Such situation is probably due to the *A. baumannii* long-term ability to persist and survive in hospital environments, together with the person-to-person transmission and the global human mobility. Therefore, these findings provided a more complete picture concerning the importance of high-risk pandemic clones in the international dissemination of resistance, reinforcing the need of an epidemiological tracking of *A. baumannii* XDR strains and its associated carbapenemase coding genes even outside densely populated cosmopolitan regions.

## AUTHORS' CONTRIBUTION

RVC and FSF - Performed some assays; ELF - performed some assays wrote and discussed the paper; LR - collected the bacterial isolates; ACV - conceived and conducted the study, discussed and wrote the paper.

## REFERENCES

- Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 41: 11-19.
- Rocha IV, Xavier DE, Almeida KRH, Oliveira SR, Leal NC. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clones persist on hospital inanimate surfaces. *Braz J Infect Dis*. 2018; 22(5): 438-41.
- Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5(12): 939-51.
- Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multi-resistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One*. 2010; 5(4): e10034.
- 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): 237-47.
- Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12(9): 826-36.
- Neves FC, Clemente WT, Lincopan N, Paião ID, Neves PR, Romanelli RM, et al. Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing *Acinetobacter baumannii* in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2016; 20(6): 556-63.
- Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TSR, Almeida Jr JN, Du-

- arte AJS. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *Braz J Infect Dis*. 2017; 21(1): 98-101.
9. Camargo CH, Tiba MR, Saes MR, Vasconcellos FM, Santos LF, Romero EC, et al. Population structure analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Brazil reveals predominance of clonal complexes 1, 15, and 79. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(4): 2545-7.
  10. Chagas TP, Carvalho KR, Santos ICO, Carvalho-Assef AP, 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): 468-72.
  11. Pagano M, Nunes LS, Niada M, Barth AL, Martins AF. Comparative analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* sequence types in southern Brazil: from the first outbreak (2007-2008) to the endemic period (2013-2014). *Microb Drug Resist*. 2019; 25(4): 538-42.
  12. Meshkat Z, Amini Y, Sadeghian H, Salimzand H. ISAbal/blaOXA-23-like family is the predominant cause of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Iran. *Infect Genet Evol*. 2019; 71: 60-6.
  13. 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(1): 62-5.
  14. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 22th informational supplement (M100-S27) 2017. Wayne: CLSI; 2017.
  15. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(3): 268-81.
  16. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7(2): 88-91.
  17. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 2233-9.
  18. 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): 4382-90.
  19. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward E, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 351-3.
  20. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(2): 233-8.
  21. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifer H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(12): 5035-8.
  22. Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 490-5.
  23. Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, Nordmann P. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(2): 934-6.
  24. Nicoletti AG, Marcondes MFM, Martins WMBS, Almeida LGP, Nicolás MF, Vasconcelos ATR, et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(9): 5159-64.
  25. Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51: 1530-3.
  26. Royer S, de Campos PA, Araújo BF, Ferreira ML, Gonçalves IR, Batista DWDF, et al. Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial blaOXA-23 producing XDR *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2018; 13(6): e0198643.
  27. Tavares LCB, de Vasconcelos FM, de Sousa WV, Rocchetti TT, Mondelli AL, Ferreira AM, et al. Emergence and persistence of high-risk clones among MDR and XDR *A. baumannii* at a Brazilian teaching hospital. *Front Microbiol*. 2019; 9: 2898.
  28. Levy-Blitchein S, Roca I, Plasencia-Rebata S, Vicente-Taboada W, Velásquez-Pomar J, Muñoz L, et al. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7(1): 119.
  29. Fonseca ÉL, Caldart RV, Freitas FS, Morgado SM, Rocha LT, Santos RCD, et al. Emergence of XDR international clone IC-6 *Acinetobacter baumannii* carrying blaOXA-72 and blaCTX-M-115 in the Brazilian Amazon Region. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019; S2213-7165(19): 30158-4 [Epub ahead of print].
  30. Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, Di Popolo A, Bernardo M, Tomasone F, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 1223-30.
  31. Fernández-Cuenca F, Rodríguez-Martínez JM, Gómez-Sánchez MC, Alba PD. Production of a plasmid-encoded OXA-72 beta-lactamase associated with resistance to carbapenems in a clinical isolate *Acinetobacter junii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 39: 90-4.



# APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF GLOBAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE

Journal of Global Antimicrobial Resistance 20 (2020) 18–21



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Global Antimicrobial Resistance

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jgar](http://www.elsevier.com/locate/jgar)



## Emergence of extensively drug-resistant international clone IC-6 *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*<sub>OXA-72</sub> and *bla*<sub>CTX-M-115</sub> in the Brazilian Amazon region

Érica L. Fonseca<sup>a,\*</sup>, Raquel V. Caldart<sup>a,b</sup>, Fernanda S. Freitas<sup>a</sup>, Sergio M. Morgado<sup>a</sup>, Luisa T. Rocha<sup>c</sup>, Regiany C dos Santos<sup>d</sup>, Ana Carolina P. Vicente<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, Roraima, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório Central de Saúde Pública de RR/LACEN-RR, Boa Vista, Roraima, Brazil

<sup>d</sup> Hospital Geral de Roraima, Boa Vista, Roraima, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 February 2019

Received in revised form 11 April 2019

Accepted 17 June 2019

Available online 25 June 2019

#### Keywords:

International clone

*Acinetobacter baumannii*

Resistome

Mobilome

*bla*<sub>CTX-M-115</sub>

Extensively drug-resistant

### ABSTRACT

**Objectives:** The extensively drug-resistant (XDR) *Acinetobacter baumannii* international clone VI (IC-6) has been identified worldwide since 2006. This study reports the emergence of IC-6 in the Brazilian Amazon region and reveals the particular genomic features considering its mobilome and resistome.

**Methods:** A total of 32 carbapenem-resistant *A. baumannii* strains recovered from Boa Vista city (Roraima, Brazil) in 2016 were characterised by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). The whole genome sequences of the Brazilian IC-6 strains were obtained. The mobilome and resistome were assessed by in silico analyses.

**Results:** PFGE and MLST demonstrated that the 32 *A. baumannii* strains belonged to four clones. One XDR clone corresponded to the high-risk pandemic IC-6 lineage from ST944<sup>Oxf/78Pas</sup>. The IC-6 resistome was composed of *aadA5*, *aac(3<sup>+</sup>)-IIa*, *aph(3<sup>+</sup>)-Ia*, *armA*, *aadB*, *msrE*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *IS15DIV-bla<sub>CTX-M-115</sub>-IS15DIV*, *bla<sub>OXA-90</sub>*, *ISAbal-bla<sub>A1C-152</sub>*, *bla<sub>OXA-72</sub>*, *qacE Δ1* and *sulI*. Mobilome prediction revealed that *bla<sub>OXA-72</sub>* was embedded in a 15.5-kb plasmid and that it was flanked by putative XerC/D-binding sites, possibly involved in *bla<sub>OXA-72</sub>* mobilisation. Several resistance genes were in a 48-kb multidrug resistance genomic island inserted in the chromosome, which also harboured genes involved in host pathogenicity and adaptive traits. Interestingly, the Brazilian strains shared the *bla<sub>OXA-72</sub>* and *bla<sub>CTX-M-115</sub>* with IC-6/ST944<sup>Oxf/78Pas</sup> recovered in a distinct spatiotemporal context, pointing to an epidemiological link among them.

**Conclusion:** This study highlights the importance of surveillance of XDR *A. baumannii* strains, even outside of densely populated cosmopolitan regions, to reveal the epidemiology of pandemic lineages, stressing their threat to public health.

© 2019 International Society for Antimicrobial Chemotherapy. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Acinetobacter baumannii* pandemic lineages, named international clones, are spread across continents, causing outbreaks and presenting multidrug-resistant phenotypes. International clone VI (IC-6) belongs to the carbapenem-resistant *A. baumannii* ST944<sup>Oxf/78Pas</sup> [Oxford/Pasteur multilocus sequence typing (MLST) scheme] [1,2] and presents high biofilm-forming ability, increased resistance to desiccation and an enhanced capacity for host cell

adhesion/invasion, favouring its diffusion and persistence [3]. Since 2006, IC-6 has been identified in European countries (Italy, Russia, Greece and Germany), Asia (Kuwait) and North and South America (the USA and French Guiana) [1,4–9].

In the context of surveillance of carbapenem-resistant *A. baumannii* infections in a hospital from the Brazilian Amazon region, we verified the occurrence of the pandemic IC-6/ST944<sup>Oxf/78Pas</sup> lineage and revealed particular genomic features considering its mobilome and resistome.

### 2. Materials and methods

A total of 32 nosocomial carbapenem-resistant *A. baumannii* strains were recovered from distinct inpatients, biological material

\* Corresponding author. Present address: Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.  
E-mail address: [ericafon@ioc.fiocruz.br](mailto:ericafon@ioc.fiocruz.br) (É.L. Fonseca).

and wards of the General Hospital of Roraima (Boa Vista, Roraima, Brazil) in 2016. Following identification using an automated VITEK® 2 system, the species was confirmed by sequencing of 16S rRNA and the *bla*<sub>OXA-51</sub> gene, which is a genetic marker of this species. The strains were genotyped by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and MLST following the Oxford and Pasteur schemes (<https://pubmlst.org/abaumannii/>) as described previously [1].

Antimicrobial susceptibility testing was performed by Etest (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) on Mueller–Hinton agar for gentamicin, amikacin, tobramycin, imipenem, meropenem, doripenem, ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam (TZP), ticarcillin/clavulanic acid, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), tetracycline and minocycline. The minimum inhibitory concentration (MIC) of polymyxin B was assessed by the broth microdilution method with antibiotic concentrations ranging from 0.1–64 µg/mL. Contemporary interpretive criteria from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) were applied in all cases [10]. Carbapenemase production was verified by the modified Hodge test.

Whole-genome sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2500 sequencer (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) using a Nextera XT paired-end run with a 500-bp insert library at the High-Throughput Sequencing Platform of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil).

In silico antimicrobial resistance gene (ARG) prediction and plasmid searches were performed using the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD), plasmidSPAdes and PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>). The plasmid topology (linear or circular) was verified in silico as previously described [11].

Genomic island prediction was assessed by IslandViewer web server (<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>) and GIP-Sy software (<http://www.bioinformatics.org/groups/?group-id=1180>) (<http://www.bioinformatics.org/groups/?group-id=1180>), and insertion sequence (IS) elements were searched and classified according to the ISfinder database (<http://www-is.biotoul.fr>).

### 3. Results and discussion

The PFGE profile demonstrated that the 32 *A. baumannii* strains belonged to four clones: clone A ( $n = 5$ ); clone B ( $n = 15$ ); clone C ( $n = 9$ ); and clone D ( $n = 3$ ). Clones B, C and D were assigned as new STs by MLST. Interestingly, clone A belonged to ST944<sup>Oxf</sup>/78<sup>PaS</sup>, which corresponds to the high-risk pandemic IC-6 lineage.

According to the current resistance definition criteria [12], all five IC-6 strains presented an extensively drug-resistant (XDR) phenotype since the strains were susceptible only to polymyxin B and tetracyclines (tetracycline and minocycline) (Table 1). The remaining 27 strains were resistant or multidrug-resistant [12], with the highest resistance rates to meropenem, TZP and SXT.

To perform an in-depth characterisation of the Brazilian IC-6 strains, two strains were submitted to high-throughput sequencing. The genome sequences are found under the GenBank accession nos. [RJLV00000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/RJLV00000000) (AB4332) and [RJLW00000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/RJLW00000000) (AB5375).

Resistome mining of the Brazilian IC-6 genomes identified genes conferring resistance to aminoglycosides [*aadA5*, *aac(3'')-IIa*, *aph(3'')-Ia*, *armA* and *aadB*], macrolides (*msrE*), β-lactams and carbapenems (*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-115</sub>, *bla*<sub>OXA-90</sub>, *bla*<sub>ADC-152</sub> and *bla*<sub>OXA-72</sub>), disinfectant compounds (*qacEΔ1*) and sulfonamides (*sul1*) (Table 2).

The *bla*<sub>OXA-90</sub> gene, identified in the same chromosomal region both in strains AB4332 and AB5375, is a variant of the intrinsically-encoded *bla*<sub>OXA-51</sub> family, which is a genetic marker of *A. baumannii* species. No IS<sub>Aba</sub> sequence was found associated with this gene.

**Table 1**

Susceptibility profile of five Brazilian *Acinetobacter baumannii* from the international clone VI (IC-6) lineage.

Antimicrobial agent	MIC (µg/mL) <sup>a</sup>
Gentamicin	≥256
Amikacin	≥256
Tobramycin	≥1024
Imipenem	≥32
Meropenem	≥32
Doripenem	16
Ciprofloxacin	≥32
Ampicillin/sulbactam	32
Piperacillin/tazobactam	≥256
Ticarcillin/clavulanic acid	≥256
Cefotaxime	≥256
Ceftazidime	≥256
Cefepime	≥256
Trimethoprim/sulfamethoxazole	≥32
Tetracycline	1
Minocycline	0.75
Polymyxin B	1

MIC, minimum inhibitory concentration.

<sup>a</sup> MICs were determined by Etest, except for polymyxin B which were determined by broth microdilution.

On the other hand, the *bla*<sub>ADC-152</sub> gene, also found in the chromosome, was preceded by IS<sub>Aba1</sub> (Table 2). Curiously, this allele presents amino acid substitutions (Asp220 and Gly320) that have been previously demonstrated to be involved in extension of the enzyme substrate specificity and acquisition of carbapenemase activity [13]. Therefore, the cephalosporin and carbapenem resistance observed in the Brazilian IC-6 strains can be also a consequence of the overexpression of *bla*<sub>ADC-152</sub> driven by IS<sub>Aba1</sub> [14].

The *bla*<sub>CTX-M-115</sub> gene was flanked by two IS<sub>15DIV</sub> elements (Table 2). However, it was not possible to determine whether the IS<sub>15DIV</sub>-*bla*<sub>CTX-M-115</sub>-IS<sub>15DIV</sub> was located on a plasmid or on the chromosome since the assembled contigs were too small. IS<sub>15DIV</sub> belongs to the IS6 family and has previously been identified flanking the *bla*<sub>NDM-16</sub> gene carried by a plasmid in a clinical *Escherichia coli* strain [15] as well as upstream of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in *Klebsiella pneumoniae* clinical strains [16].

In silico analyses for plasmid prediction and topology determination revealed that a 15.5-kb contig corresponded to a circular plasmid carrying the conjugal transfer gene *traA* and the *virB6* gene as well as genes coding for the RelE/ParE toxin-antitoxin system. Moreover, this plasmid harboured *bla*<sub>OXA-72</sub>, which was not associated with any IS element. Interestingly, it was previously demonstrated that *bla*<sub>OXA-72</sub> contributes to carbapenem resistance even in the absence of IS<sub>Aba</sub> sequences [17–19].

Several studies have previously reported the presence of *bla*<sub>OXA-72</sub> in different plasmids, STs, *Acinetobacter* spp. and countries, including Brazil [18–20]. These epidemiological data demonstrate the mobilisation potential of *bla*<sub>OXA-72</sub>. The *bla*<sub>OXA-72</sub> gene has been associated with binding sites homologous to those recognised by XerC/XerD recombinases [17,19,20], which could explain the heterogeneity of genetic contexts (different plasmids) in which *bla*<sub>OXA-72</sub> has been found. In fact, the *bla*<sub>OXA-72</sub> gene identified here was flanked by the same XerC/XerD putative binding sites previously reported in association with *bla*<sub>OXA-72</sub> harboured by an 8.9-kb plasmid found in an IC-2 strain recovered from Italy in 2004 [17].

Besides the plasmid carrying *bla*<sub>OXA-72</sub>, in silico mobilome mining revealed the presence of a 48-kb multidrug resistance genomic island (MDR GI) where the majority of the aforementioned ARGs were identified, including *aadA5*, *aac(3'')-IIa*, *aph(3'')-Ia*, *armA*, *aadB*, *msrE*, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *qacEΔ1* and *sul1*. Interestingly, several of these ARGs were flanked by ISs, which could account for their mobilisation and expression. This MDR GI, which was



**Table 2**  
Epidemiological, phenotypic and genotypic features of international clone VI (IC-6) ST944<sup>Oxf</sup>/78<sup>Pas</sup> *Acinetobacter baumannii* genomes.

Strain	Isolation year	Isolation data (ward/hospital/country)	Isolate source	MLST (Oxford/Pasteur)	Antimicrobial resistance genes/mutations
AB4332 <sup>a</sup>	16 Oct. 2016	TRM/HGR/Brazil	Tracheal secretion	ST944/78	<i>bla</i> <sub>OXA-90</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-72</sub> , <i>IS15DIV</i> – <i>bla</i> <sub>CTX-M-115</sub> – <i>IS15DIV</i> , <i>ISAbal</i> – <i>bla</i> <sub>ADC-152</sub> , <i>aadA5</i> , <i>aac</i> (3′)- <i>Ila</i> , <i>aph</i> (3′)- <i>Ia</i> , <i>armA</i> , <i>aadB</i> , <i>msrE</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>qac</i> Δ <i>I</i> , <i>sul1</i> , <i>GyrA</i> (Ser83Leu), <i>ParC</i> (Ser80Leu)
AB5375 <sup>a</sup>	29 Dec. 2016	ICU/HGR/Brazil	Tracheal secretion	ST944/78	<i>bla</i> <sub>OXA-90</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-72</sub> , <i>IS15DIV</i> – <i>bla</i> <sub>CTX-M-115</sub> – <i>IS15DIV</i> , <i>ISAbal</i> – <i>bla</i> <sub>ADC-152</sub> , <i>aadA5</i> , <i>aac</i> (3′)- <i>Ila</i> , <i>aph</i> (3′)- <i>Ia</i> , <i>armA</i> , <i>aadB</i> , <i>msrE</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>qac</i> Δ <i>I</i> , <i>sul1</i> , <i>GyrA</i> (Ser83Leu), <i>ParC</i> (Ser80Leu)
AB3909	11 May 2007	Italy	Bronchial aspirate	ST944/78	<i>aadB</i> , <i>sul1</i> , <i>aph</i> (3′)- <i>Ia</i> , <i>bla</i> <sub>OXA-90</sub> , <i>ISAbal</i> – <i>bla</i> <sub>ADC-152</sub> , <i>floR</i> , <i>bla</i> <sub>OXA-58</sub> , <i>ant</i> (3′)- <i>II</i> , <i>GyrA</i> (Ser83Leu), <i>ParC</i> (Ser80Leu)

MLST, multilocus sequence typing; TRM, traumatology unit; HGR, General Hospital of Roraima; ICU, intensive care unit

<sup>a</sup> Isolates from the current study.

embedded in the chromosome, also harboured phage-related and adhesion/biofilm formation genes (*big-1* and *bap*) from the intimin/invasin protein family, which are involved in host cell attachment/invasion. Genes related to adaptive traits (*mutT*), DNA repair (*umuD*), stress tolerance (*nirD*) and pathogenicity (*mgtC*, *pilB* and peptidase-coding genes) were also present.

The genomic features of the unique Italian IC-6 genome (strain 3909 recovered in 2007) available in GenBank (accession no. [GCA\\_000189695.2](#)) [1] was also assessed in order to compare it with the Brazilian IC-6 genomes (recovered in 2016). They shared the ARGs *aadB*, *sul1*, *aph*(3′)-*Ia*, *bla*<sub>ADC-152</sub> and *bla*<sub>OXA-90</sub> as well as the adaptation-related *mutT*, *nirD*, *mgtC*, *pilB* and peptidase-coding genes. Exceptions were *umuD*, *bla*<sub>OXA-72</sub> and *bla*<sub>CTX-M-115</sub>, which were exclusively found in IC-6 Brazilian genomes. In this case, *bla*<sub>CTX-M-115</sub> and *bla*<sub>OXA-72</sub> could have been acquired by the Brazilian IC-6 strains by mobilisation events mediated by *IS15DIV* and *XerC/D*, respectively. Fluoroquinolone resistance-associated mutations were also observed in *GyrA* (Ser83Leu) and *ParC* (Ser80Leu) deduced proteins of Brazilian and Italian genomes (Table 2).

Spatiotemporal heterogeneity of the OXA-type genes in IC-6 strains identified in several countries since 2006 has been observed. The *bla*<sub>OXA-58</sub> gene characterised the ST944<sup>Oxf</sup>/78<sup>Pas</sup> strains recovered between 2006–2010 in Italy [1], being posteriorly replaced by *bla*<sub>OXA-23</sub> in that same country. This allele was the same as identified among the IC-6 strains circulating in French Guiana between 2008–2014 [9]. However, different from the IC-6 strains occurring in the aforementioned countries that harboured *bla*<sub>OXA-58</sub> or *bla*<sub>OXA-23</sub>, the OXA carbapenemase gene identified in IC-6 from the USA (2009), Kuwait (2011–2012), Russia (2012–2015), Germany (2013) and Greece (2015) [4–8] was *bla*<sub>OXA-72</sub> from the *bla*<sub>OXA-40-like/OXA-24-like</sub> family, as found in the Brazilian strains described in the current study. The Brazilian strains also shared *bla*<sub>CTX-M-115</sub> with IC-6/ST944<sup>Oxf</sup>/78<sup>Pas</sup> from Russia/Germany and the USA [4,6,8]. However, the *bla*<sub>CTX-M-115</sub> found in Brazil was associated with *IS15DIV*, whilst in strains from Russia/Germany it was associated with *ISEcp1* [6]. Therefore, these results altogether indicated that the Brazilian IC-6/ST944<sup>Oxf</sup>/78<sup>Pas</sup> strains would have arisen due to gain/loss of mobile genetic elements harbouring such ARGs.

This study revealed the emergence of the IC-6/ST944<sup>Oxf</sup>/78<sup>Pas</sup> in a clinical setting of Boa Vista (Roraima, Brazil), which has been persisting for ≥1 year. Interestingly, these Brazilian strains shared the *bla*<sub>OXA-72</sub> and *bla*<sub>CTX-M-115</sub> genes with IC-6/ST944<sup>Oxf</sup>/78<sup>Pas</sup> strains recovered in a distinct spatiotemporal context (USA, 2009; Russia, 2016) [4,6,8], which points to a direct epidemiological link among them. Moreover, besides the XDR phenotype, the Brazilian IC-6 strains presented genetic determinants related to adaptive traits, adhesion and biofilm formation, which corroborates the high biofilm growth capability that characterises this lineage and contributes to its spread and persistence globally [3].

Therefore, this study highlights the importance of epidemiological surveillance of XDR *A. baumannii* strains even outside of densely populated cosmopolitan regions in order to reveal the dispersion/occurrence of such high-risk pandemic lineages owing to their exceptional versatility and threat to public health.

#### Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [finance code 001] and the Oswaldo Cruz Foundation.

#### Competing interests

None declared.

#### Ethical approval

Not required.

#### References

- Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, Di Popolo A, Bernardo M, Tomasone F, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. *J Clin Microbiol* 2010;48:1223–30.
- 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.
- Giannouli M, Antunes LC, Marchetti V, Triassi M, Visca P, Zarrilli R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I–III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect Dis* 2013;13:282.
- Mayanskiy N, Chebotar I, Alyabieva N, Kryzhanovskaya O, Savinova T, Turenok A, et al. Emergence of the uncommon clone ST944/ST78 carrying *bla*<sub>OXA-40-like</sub> and *bla*<sub>CTX-M-115</sub> genes among carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in Moscow, Russia. *Microb Drug Resist* 2017;23:864–70.
- Pournaras S, Dafopoulou K, Del Franco M, Zarkotou O, Dimitroulia E, Protonotariou E, et al. Predominance of international clone 2 OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece, 2015: results of a nationwide study. *Int J Antimicrob Agents* 2017;49:749–53.
- Pfeifer Y, Hunfeld KP, Borgmann S, Maneg D, Blobner W, Werner G, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST78 with OXA-72 carbapenemase and ESBL gene *bla*<sub>CTX-M-115</sub>. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1426–8.
- Vali L, Dashti K, Opazo-Capurro AF, Dashti AA, Al Obaid K, Evans BA. Diversity of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* population in a major hospital in Kuwait. *Front Microbiol* 2015;6:743.
- Munoz-Price LS, Arheart K, Nordmann P, Boulanger AE, Cleary T, Alvarez R, et al. Eighteen years of experience with *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital. *Crit Care Med* 2013;41:2733–42.
- Mahamat A, Bertrand X, Moreau B, Hommel D, Couppie P, Simonnet C, et al. Clinical epidemiology and resistance mechanisms of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, French Guiana, 2008–2014. *Int J Antimicrob Agents* 2016;48:51–5.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI; 2019.

- [11] Jørgensen TS, Xu Z, Hansen MA, Sørensen SJ, Hansen LH. Hundreds of circular novel plasmids and DNA elements identified in a rat cecum metagenome. *PLoS One* 2014;9:e87924.
- [12] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81.
- [13] Jeon JH, Hong MK, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, et al. Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum  $\beta$ -lactamase isolated from *Acinetobacter baumannii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2014;70:2924–36.
- [14] Lopes BS, Amyes SGB. Role of *ISAbal1* and *ISAbal25* in governing the expression of *bla<sub>ADC</sub>* in clinically relevant *Acinetobacter baumannii* strains resistant to cephalosporins. *J Med Microbiol* 2012;61:1103–8.
- [15] Li X, Mu X, Zhang P, Zhao D, Ji J, Quan J, et al. Detection and characterization of a clinical *Escherichia coli* ST3204 strain coproducing NDM-16 and MCR-1. *Infect Drug Resist* 2018;11:1189–95.
- [16] Becker L, Fuchs S, Pfeifer Y, Semmler T, Eckmanns T, Korr G, et al. Whole genome sequence analysis of CTX-M-15 producing *Klebsiella* isolates allowed dissecting a polyclonal outbreak scenario. *Front Microbiol* 2018;9:322.
- [17] D'Andrea MM, Giani T, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P, et al. Characterization of pABVA01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;3528–33.
- [18] Werneck JS, Picão RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:452–4.
- [19] Fernández-Cuenca F, Rodríguez-Martínez JM, Gómez-Sánchez MC, Alba PD. Production of a plasmid-encoded OXA-72  $\beta$ -lactamase associated with resistance to carbapenems in a clinical isolate *Acinetobacter junii*. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:90–4.
- [20] Brasiliense DM, Lima KVB, Pérez-Chaparro PJ, Mamizuka EM, Souza CO, Dutra LMG, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter pittii* carrying the *bla<sub>OXA-72</sub>* gene in the Amazon region, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019;93:82–4.