



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PRISCILA ROMANIN

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AOS
ANTIMICROBIANOS E DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM
Acinetobacter baumannii ISOLADOS DE CORRENTE
SANGUÍNEA**

Londrina
2018

PRISCILA ROMANIN

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AOS
ANTIMICROBIANOS E DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM
Acinetobacter baumannii ISOLADOS DE CORRENTE
SANGUÍNEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Lucy Megumi
Yamauchi Lioni

Coorientadora: Profa. Dra. Floristher Elaine
Carrara-Marroni

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Romanin, Priscila.

Caracterização fenotípica e molecular de determinantes de resistência adquirida aos antimicrobianos e da produção de biofilme em *Acinetobacter baumannii* isolados de corrente sanguínea / Priscila Romanin. - Londrina, 2018.
120 f.

Orientador: Lucy Megumi Yamauchi Lioni.

Coorientador: Floristher Elaine Carrara-Marroni.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Resistência bacteriana aos antimicrobianos - Tese. 2. Beta-lactamases - Tese. 3. Virulência bacteriana - Tese. 4. *Acinetobacter baumannii* - Tese. I. Yamauchi Lioni, Lucy Megumi. II. Carrara-Marroni, Floristher Elaine. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

PRISCILA ROMANIN

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AOS
ANTIMICROBIANOS E DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM
Acinetobacter baumannii ISOLADOS DE CORRENTE SANGUÍNEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Floristher Elaine Carrara-Marroni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Suelen Balero de Paula Petrolí
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Londrina, 09 de março de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo a minha abençoada família. Aos meus amados pais Paulo e Maria, por serem meu porto seguro, meu exemplo de dedicação e esforço, por me ensinarem que a maior riqueza é o amor e o conhecimento. A minha irmã Jaqueline, por todo o apoio e por sempre acreditar, e me lembrar, da minha capacidade. A vocês, eu agradeço pelo amor incondicional, carinho, cuidado, proteção, e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre caminhar junto comigo. Por me acolher em seus braços nos momentos difíceis, iluminar meus caminhos, e me dar força para chegar aqui.

Agradeço à toda a minha família, que sempre acreditaram em mim, me apoiaram, e estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço à minha orientadora Profa. Lucy Megumi Yamauchi Lioni pela oportunidade, confiança, e esforço para me ajudar sempre que precisei.

Agradeço à minha coorientadora Profa. Floristher Elaine Carrara-Marroni por me acolher em seu laboratório, pelos anos de aprendizado, por confiar em minha capacidade, e acreditar no meu potencial. Flor, muito obrigada por tudo.

Agradeço a Profa. Suelen Balero de Paula Petroli por aceitar participar da banca de qualificação e defesa. Su, agradeço o carinho, a dedicação, e os conselhos, e por estar sempre com um sorriso para ajudar.

Agradeço a Profa. Sueli Fumie Yamada Ogatta por aceitar participar da banca de qualificação e por sempre se disponibilizar a ajudar.

Agradeço a Profa. Maria Cristina Bronharo Tognim por aceitar participar da banca de defesa e por possibilitar a utilização e auxílio nas análises do BioNumerics. Agradeço também aos seus alunos Márcia Maria dos Anjos Szczerepa e Pedro Marquetti que foram essenciais para a utilização do BioNumerics. Muito obrigada pela ajuda, gentileza, e dedicação.

Agradeço ao Prof. Carlos Nozawa e a Profa. Rosa Elisa Carvalho Linhares por todo o carinho que sempre tiveram comigo, pela oportunidade que me concederam, e por me transmitiram o amor pela microbiologia.

Agradeço à Profa. Renata Cristina Picão por gentilmente ceder as cepas controle utilizadas neste estudo, e pelo direcionamento do artigo.

Agradeço ao Prof. Emerson José Venancio por permitir a utilização dos equipamentos de seu laboratório.

Agradeço à Prof. Eiko Nakagawa Itano por disponibilizar seu

laboratório para a utilização do NanoDrop.

Agradeço as professoras do HU, em especial, à Profa. Márcia Regina Eches Perugini pela oportunidade proporcionada ao me acolher no laboratório e por me ajudar sempre que precisei.

Agradeço a equipe do HU, em especial a Néia e Fábio por me ensinarem e confiarem em meu trabalho.

Agradeço ao Departamento de Genética da UEL, em especial ao Lucas, pela realização do sequenciamento das amostras.

Agradeço aos funcionários do AE-HU, em especial ao Rui, por sempre estar com um sorriso no rosto e me alegrar.

Agradeço a todos os professores e colegas do mestrado por todo o aprendizado e bons momentos.

Agradeço aos amigos de laboratório Jônatas Fernando Cavalini e Larissa dos Santos Fávaro pela ajuda, companheirismo, e risadas.

Aos meus amigos Janássia Gondim Monteiro, Thiago Yudi Fukunaga e Milton Tomaz Junior pelos momentos de descontração, desabafos, e amizade.

Agradeço às minhas amigas Rosemeire Correia Pestana, Francielle Marcatto, Ana Camila Munis Jardim e Dayane Bonetti que são os presentes que a faculdade meu deu. Muito obrigada por todos os momentos de amizade.

Agradeço à minha querida amiga Raquel Lima Palermo, por ser minha companheira de estudos, de laboratório, de aventuras. Muito obrigada por me escutar, aconselhar, acalmar, e me ajudar. Agradeço imensamente por dividir as tristezas e compartilhar as alegrias.

E agradeço a todos os meus professores e todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para meu conhecimento, e que sempre torceram e rezaram por mim.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa.

“A curiosidade tem sua própria razão de existir. Uma pessoa não pode deixar de se sentir admirada ao contemplar os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade. Basta que a pessoa tente apenas compreender um pouco mais desse mistério a cada dia. Nunca perca a sagrada curiosidade.”

— **Albert Einstein**

ROMANIN, Priscila. **Caracterização fenotípica e molecular de determinantes de resistência adquirida aos antimicrobianos e da produção de biofilme em *Acinetobacter baumannii* isolados de corrente sanguínea**. 2018. 120 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A. baumannii multirresistentes constituem um dos maiores desafios mundiais no tratamento de infecções hospitalares. A facilidade em adquirir determinantes de resistência somada a capacidade de formação de biofilme representam importantes fatores associados ao sucesso da disseminação e à permanência deste microrganismo nos hospitais. Este estudo teve como objetivo caracterizar os principais mecanismos de resistência adquirida aos antimicrobianos e investigar a capacidade de formação de biofilme em isolados multirresistentes de *A. baumannii* isolados de corrente sanguínea de pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina (HU) no período de novembro de 2006 a dezembro de 2016. Um total de 103 isolados foram analisados, sendo todos identificados como *A. baumannii* por meio da amplificação dos genes *bla*_{OXA-51-like} e *rpoB*. A análise dos aspectos clínicos revelou que os isolados de *A. baumannii* foram recuperados predominantemente de pacientes do sexo masculino, com idade média de 60 anos, internados nas unidades de terapia intensiva, com uma média de permanência hospitalar de 28 dias. O desfecho clínico que resultou em mortalidade foi observado na maioria (81.6%) dos pacientes. Altas taxas de resistência (100.0%-10.7%) foram obtidas para os antimicrobianos avaliados incluindo colistina, polimixina B e tigeciclina e, na sua maioria, os isolados foram classificados como extensivamente resistentes (78.6%). A produção de carbapenemases foi observada em em 92.2% dos isolados. Todos os isolados resistentes aos carbapenêmicos apresentaram um dos genes codificadores das *carbapenem hydrolyzing class-D β-lactamase* (CHDL) adquiridas *bla*_{OXA-23-like} (97.9%) ou *bla*_{OXA-143-like} (2.1%). Nenhum dos isolados apresentou os genes *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, *bla*_{GES}, *mcr-1*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, and *qnrVc*. Como contexto genético do gene *bla*_{OXA-23-like} predominou o Tn2006 e em menor frequência o Tn2008. Os isolados carreadores do gene *bla*_{OXA-143-like} apresentaram a variante *bla*_{OXA-253-like}. O gene *bap* foi detectado em 83.5% dos isolados, e todos os isolados recuperados após o ano de 2011 apresentaram este gene. A maioria dos isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme (98.0%), e 86.4% dos isolados foram fortes formadores de biofilme. Um perfil policlonal foi observado dentre os isolados de *A. baumannii*, sendo detectada a presença dos complexos clonais epidêmicos internacionais CC113/79, CC109/1, CC110/25, e CC103/15, com prevalência do CC113/79. Os dados obtidos mostram que a produção de CHDL e, principalmente, a permanência do gene *bla*_{OXA-23} constituiu um importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* no HU. As altas taxas de resistência aos antimicrobianos obtidas e o número elevado de isolados extensivamente resistentes demonstram a dificuldade no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* no HU e alertam para a emergência de infecções intratáveis. O perfil policlonal, a prevalência de clones epidêmicos mundiais, e a capacidade de formação de biofilme reforçam a importância de medidas de controle de infecção e da necessidade

continua do desenvolvimento de programas de *stewardship* para evitar a disseminação de novos determinantes de resistência e potenciais surtos por este patógeno.

Palavras-chave: Extensivamente resistente. CHDL. Tn2006. Diversidade genética. Complexos clonais.

ROMANIN, Priscila. **Phenotypic and molecular characterization of acquired antimicrobial determinants of resistance and biofilm production of *Acinetobacter baumannii* isolated from bloodstream**. 2018. 120 pp. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Multidrug-resistant *A. baumannii* is one of the greatest worldwide challenges in the treatment of nosocomial infections. Acquisition of antimicrobial resistance determinants associated with biofilm formation ability represent important factors associated with the success of the dissemination and permanence of these microorganisms in hospitals. This study aimed to characterize the main mechanisms of acquired antimicrobial resistance and biofilm formation capacity in isolates of *A. baumannii* isolated from the bloodstream of patients hospitalized at Hospital Universitário de Londrina (HU) in the period of November 2006 to December 2016. A total of 103 isolates were analyzed, all of which were identified as *A. baumannii* by amplification of the *bla*_{OXA-51-like} and *rpoB* genes. The analysis of clinical aspects revealed that *A. baumannii* isolates were predominantly recovered from male patients with mean age of 60 years hospitalized in intensive care units with an average of 28 days of hospital stay. Intrahospital mortality was observed in the majority (81.6%) of the patients. High resistance rates (100.0% -10.7%) were obtained for the evaluated antimicrobials including colistin, polymyxin B and tigecycline, and most isolates were classified as extensively resistant (78.6%). The production of carbapenemases was observed in 92.2% of the isolates. All carbapenem-resistant isolates showed a carbapenem-hydrolyzing class-D β -lactamase being either *bla*_{OXA-23-like} or *bla*_{OXA-143-like}. None of the isolates had the genes *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, *bla*_{GES}, *mcr-1*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, and *qnrVc*. As a genetic context of the *bla*_{OXA-23-like} gene, Tn2006 was predominated, and Tn2008 was less frequent. Isolates harboring the *bla*_{OXA-143-like} gene showed the *bla*_{OXA-253-like} variant. The *bap* gene was detected in 83.5% of the isolates, and all the isolates recovered after the year 2011 presented this gene. Most of the isolates presented biofilm formation capacity (98.0%), and 86.4% of the isolates were strong biofilm producers. A polyclonal profile was observed among the *A. baumannii* isolates. The presence of the international clonal complexes CC113/79, CC109/1, CC110/25, and CC103/15 were detected, with prevalence of CC113/79. The results demonstrate that the production of CHDL and, mainly, the permanence of the *bla*_{OXA-23-like} gene constitutes an important mechanism of resistance to carbapenems in *A. baumannii* in HU. The high antimicrobial resistance rates obtained and the large number of extensively resistant isolates demonstrate the difficulty in treating infections caused by *A. baumannii* in HU and alert to the emergence of untreatable infections. The polyclonal profile, the prevalence of global epidemic clones, and the biofilm formation ability reinforce the importance of infection control measures and the urgent need to develop stewardship programs to avoid the spread of new resistance determinants and potential outbreaks by this pathogen.

Key words: Extensively drug-resistant. CHDL. Tn2006. Genetic diversity. Clonal complexes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos de ação e resistência aos principais antimicrobianos	31
Figura 2 – Estrutura de sequências de inserção	33
Figura 3 – Estrutura de um integron de classe 1	34

ARTIGO A

Figure 1 – Temporal evolution of <i>A. baumannii</i> clusters.....	81
Figure 2 – Temporal evolution of <i>A. baumannii</i> clonal complexes.....	82
Figure 3 – Frequency of <i>bap</i> in <i>A. baumannii</i> isolates from bloodstream.....	85
Figure 4 – Frequency of biofilm production among the <i>A. baumannii</i> isolated from bloodstream.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classes de antimicrobianos utilizados para o tratamento de <i>Acinetobacter</i> spp.	28
Tabela 2 –	Principais carbapenemases em <i>A. baumannii</i> de acordo com a classificação de Ambler	37
Tabela 3 –	Variantes enzimáticas das Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -lactamase	39

ARTIGO A

Table 1 –	Clinical characteristics of the patients with <i>A. baumannii</i> isolated from bloodstream	78
Table 2 –	Antimicrobial susceptibility profile of the <i>A. baumannii</i> isolated from bloodstream	79
Table 3 –	Minimum inhibitory concentration of ceftazidime, carbapenems, polymyxins and tigecycline for <i>A. baumannii</i> isolates	79
Table 4 –	Associations of carbapenemase production, resistance classification and clonal complexes with OXA genes profiles of <i>A. baumannii</i>	80
Table 5 –	Frequency of international clonal complexes in <i>A. baumannii</i>	81
Table 6 –	Clinical characteristics and molecular profile of the <i>A. baumannii</i> isolates in Cluster H.....	84
Table 7 –	Clinical characteristics and molecular profile of the <i>A. baumannii</i> isolates in Cluster D.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DOS	2-deoxistreptamina
AAC	Acetiltransferases
AHL	Acil homoserina lactona
AMEs	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
ANT	Nucleotidiltransferases
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
APH	Fosfotransferases
Ata	<i>Acinetobacter trimeric autotransporter adhesin</i>
Bap	<i>Biofilm associated protein</i>
<i>bla</i>	β -lactamase
BGN	Bacilos Gram-negativos
CC	Clonal complex
CCIH	Comissão de controle infecção hospitalar
CDC	<i>Centers for disease control and prevention</i>
CHDL	<i>Carbapenem-hydrolyzing Class D β-lactamases</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CRAB	<i>Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii</i>
ECDC	<i>European centre for disease prevention and control</i>
ER	Extensivamente resistentes
EUA	Estados Unidos
GES	<i>Guiana extended spectrum</i>
GIM	German Imipenemase
HU	Hospital Universitário de Londrina
IMP	Imipenemase
IS	Sequências de inserção
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LEMRA	Laboratório de estudos moleculares e resistência antimicrobiana
LOS	Lipoligossacarídeos
MBLs	Metalo-beta-lactamases
<i>mcr</i>	<i>Plasmid-mediated colistin resistance</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MR	Multirresistentes

NDM	New Delhi metalo- β -lactamase
Omp	<i>Outer membrane protein</i>
OMS	Organização mundial da saúde
OMVs	Vesículas de membrana externa
OXA	Oxacilinase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBPs	<i>Penicillin binding-proteins</i>
<i>qnr</i>	<i>Quinolone resistance</i>
PR	Pan-resistentes
RA	Resistência antimicrobiana
SIM	Seoul imipenemase
SPM	São Paulo metalo- β -lactamase
SST2	Sistemas de secreção tipo II
SST6	Sistemas de secreção tipo VI
VIM	<i>Verona integron-encoded</i> metalo- β -lactamase
UTI	Unidades de terapia intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>ACINETOBACTER</i> SPP.....	21
2.2	RESERVATÓRIOS E INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>ACINETOBACTER</i> SPP	22
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA E REGULAÇÃO GÊNICA DE <i>ACINETOBACTER</i> <i>BAUMANNII</i>	23
2.4	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	27
2.4.1	Definições Relacionadas à Resistência.....	27
2.4.2	Impacto Clínico da Resistência aos Antimicrobianos	29
2.4.3	Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos em <i>Acinetobacter baumannii</i>	30
2.4.3.1	Sequências de inserção	32
2.4.3.2	Transposons.....	33
2.4.3.3	Integrans	34
2.4.3.4	Plasmídeos.....	35
2.4.3.5	Resistência aos carbapenêmicos	35
2.4.3.5.1	CHDL - <i>Carbapenem-hydrolyzing Class D β-lactamases</i>	38
2.4.3.5.2	Metalo-beta-lactamases	41
2.4.3.5.3	<i>KPC</i>	42
2.4.3.5.4	<i>GES</i>	43
2.4.3.6	Resistência as fluoroquinolonas	43
2.4.3.7	Resistência aos aminoglicosídeos.....	45
2.4.3.8	Resistência às polimixinas	47
2.4.3.9	Resistência a outros antimicrobianos	49
	REFERÊNCIAS	50
3	OBJETIVOS	68
3.1	OBJETIVO GERAL.....	68
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	68

4	ARTIGO A – TENDÊNCIAS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM <i>Acinetobacter baumannii</i> ISOLADOS DE CORRENTE SANGUÍNEA: UM ESTUDO DE 10 ANOS EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO BRASILEIRO	69
	APÊNDICES	100
	APÊNDICE A – Primers used in this study for molecular characterization of the <i>A. baumannii</i> isolates	101
	APÊNDICE B – Clinical and molecular characteristics of <i>A. baumannii</i> isolated from bloodstream infections.....	106
	APÊNDICE C – Dendrogram constructed from the ERIC-PCR analysis of the <i>Acinetobacter baumannii</i> strains.....	116
5	CONCLUSÃO	118

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana (RA) é a capacidade do microrganismo sobreviver em presença de um antimicrobiano, e está diretamente relacionada ao desenvolvimento de “defesas” funcionais e/ou estruturais intrínsecas e/ou adquiridas (BLAIR et al., 2014). A evolução da RA se tornou notória após a emergência de uma pandemia por *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina, algumas décadas após a sua descoberta. Até então, com a disponibilidade do uso de antimicrobianos acreditava-se que a “era de ouro” do tratamento de infecções tinha sido uma das maiores descobertas do século XX (CROFTS et al., 2017; MARINHO et al., 2016). Embora o aumento da pesquisa sobre RA decorreu após a detecção de resistência aos antimicrobianos desenvolvidos, sabe-se que este evento faz parte de um processo de seleção natural que ocorre desde os primórdios (CROFTS et al., 2017).

Uma grande preocupação em relação a RA se dá, principalmente, na facilidade de determinados microrganismos em adquirir e disseminar genes de resistência aos antibióticos no ambiente hospitalar. Em ambientes de alta pressão seletiva, a aquisição de resistência conduz a uma rápida evolução gerando microrganismos resistentes a todos os antimicrobianos utilizados. A disseminação de determinantes de RA mediada por elementos transferíveis entre as espécies bacterianas, favorece surtos de infecção neste ambiente e permite a sobrevivência dos microrganismos multirresistentes. Os principais patógenos hospitalares associados às infecções de alta morbimortalidade estão classificados no grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) (VISCA et al., 2011).

A espécie *A. baumannii* é relatada como um microrganismo de notável plasticidade genômica, capaz de adquirir, organizar e manter importantes genes que codificam resistência às diferentes classes de antimicrobianos, restringindo de forma importante as opções terapêuticas para infecções (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Segundo a lista de patógenos de prioridade global para o desenvolvimento e pesquisa de novos antimicrobianos publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2017, *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (*carbapenem-resistant A. baumannii* - CRAB) está no topo, sendo considerado um microrganismo da era “pós antimicrobiana” (WHO, 2017; TAKAHASHI; IGARASHI, 2017).

Com o aumento da detecção de isolados multirresistentes nos ambientes hospitalares, surgiu a necessidade de estabelecer medidas de controle e vigilância das infecções por estes patógenos, uma prioridade global, que uniu países com a finalidade de criar redes de vigilância para a avaliação dos principais clones disseminados mundialmente, além de desenvolver medidas de controle da RA (GONZALEZ-VILLORIA; VALVERDE-GARDUNO, 2016).

Estima-se que, anualmente, 1.7 milhões de pessoas são acometidas por infecções hospitalares no Estados Unidos (EUA), sendo que 2.7% destas infecções são causadas por *A. baumannii* (SPELLBERG; REX, 2013). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) monitora a RA no país por meio de formulários eletrônicos disponibilizados nos hospitais que possuem unidades de terapia intensiva (UTI) (ANVISA, 2016). Em relatório dos dados de RA no Brasil em 2015 publicado pela ANVISA (2016), *Acinetobacter* spp. representou o 4º agente etiológico (12.2%) mais isolado em adultos hospitalizados nas UTI que possuíam catéter venoso central, e destes isolados, 77.4% apresentaram resistência aos carbapenêmicos. De acordo com este relatório, *Acinetobacter* spp. foi o bacilo Gram-negativo (BGN) que apresentou as maiores taxas de resistência aos carbapenêmicos, considerando o isolamento de pacientes adultos e pediátricos hospitalizados nas UTI entre 2012 e 2015. De pacientes adultos, as taxas foram de 77.1% em 2012; 80.7% em 2013; 79.3% em 2014; e 77.4% em 2015. Em relação aos pacientes pediátricos as taxas de resistência aos carbapenêmicos obtidas foram de 38.8% em 2012, 46.9% em 2013, e 43.5% em 2014.

Além do impacto clínico causado pela RA, o impacto econômico representa grande preocupação devido aos gastos exorbitantes que acarretam para as instituições de saúde. Estimativas calculam que, anualmente, infecções por CRAB em pacientes internados nas UTI custem \$742 milhões de dólares para os sistemas de saúde no mundo (SPELLBERG; REX, 2013). Em estudo realizado na França, um surto em um período de 17 dias causado por *A. baumannii* produtor da carbapenemase OXA-23 custou \$474 mil dólares em gastos hospitalares gerais. Este estudo avaliou também que se o surto tivesse sido controlado neste período, o gasto hospitalar estimado seria de \$190 mil dólares (GAGNAIRE et al., 2017).

Em 2016, um relatório de RA desenvolvido por uma equipe de economistas, destacou que em 2050 o custo global da RA será de 100 trilhões de dólares e ocasionará 10 milhões de mortes se a disseminação da RA não for

controlada. O relatório mostra, também, que a RA será a principal causa de morte no mundo, superando o câncer e diabetes (O'NEILL, 2016).

O controle mundial da RA por meio de sistemas de vigilância é relatado de forma crescente. O conceito de “*One Health*” ou “uma única saúde” tem ganhado notoriedade devido a preocupação do combate à RA em todos os ambientes e setores que são acometidos, como na medicina humana e veterinária, agricultura, meio ambiente, economia, dentre outros (WU et al., 2016).

O mais recente Plano de Ação Global em RA desenvolvido pela OMS foi publicado em 2015, e baseado no conceito de *One Health* estabelece cinco objetivos para o controle e prevenção da RA, sendo eles: 1) Desenvolver o treinamento, conscientização, e conhecimento sobre RA na população, desde a infância e, principalmente, para profissionais de saúde; 2) Aumentar o conhecimento de como a RA se desenvolve nos diferentes ambientes por meio da caracterização de novos mecanismos de resistência; e do monitoramento da incidência e prevalência dos principais microrganismos, com o intuito de estabelecer programas de vigilância e pesquisa e ter maior suporte e investimentos de organizações governamentais, indústrias e agências de saúde; 3) Promover medidas de higienização e sanitário para evitar a disseminação e desenvolvimento da RA; 4) Promover o uso consciente de antimicrobianos prescritos para fins médicos ou veterinários, assim como, aumentar leis de controle de acesso e uso de antimicrobianos; 5) Aumentar os investimentos para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, vacinas, e tratamentos em geral para, principalmente, patógenos considerados críticos (WHO, 2015).

Em dados da incidência de *Acinetobacter* spp. obtidos pelo Sistema de Informação AGTA *Healthcare*, módulo LABHOS®, em 2005 *A. baumannii-calcoaceticus* representava o 10º microrganismo mais frequentemente isolado no Hospital Universitário de Londrina (HU). Entretanto, em 2013, este microrganismo figurou como o terceiro microrganismo mais isolado ficando atrás somente de *Escherichia coli* e *K. pneumoniae*. Um estudo recente realizado no HU (2014-2015) que avaliou 453 isolados de *Acinetobacter* spp. recuperados de espécimes clínicos no Laboratório de Microbiologia Clínica deste hospital mostrou altas taxas de resistência aos carbapenêmicos: 92.9% ao imipenem e 87.0% para o meropenem, sendo que destes isolados 90.2% em 2014 e 94.7% em 2015 eram multirresistentes (CAVALINI et al., 2016).

A resistência aos antimicrobianos em *Acinetobacter* spp. isolados no HU é estudada e monitorada desde 2006 pelo Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência aos Antimicrobianos (LEMRA) da Universidade Estadual de Londrina. Uma pesquisa realizada com 125 isolados de *A. baumannii* recuperados de materiais biológicos no HU entre 2006 a 2011 verificou que 68.0% dos isolados resistentes aos carbapenêmicos apresentaram o gene *bla*_{OXA-23} e pertenceram a diferentes clones, indicando a disseminação deste importante determinante de resistência no ambiente hospitalar. Adicionalmente neste estudo, uma nova variante do gene *bla*_{OXA-143-like}, denominado *bla*_{OXA-231}, foi detectado em um isolado de *A. baumannii* recuperado da urina de uma paciente internada no HU em 2007, evidenciando a introdução de um novo determinante de resistência aos carbapenêmicos neste hospital (GIONCO et al., 2012).

A limitação terapêutica devido à resistência aos antimicrobianos em *Acinetobacter* spp. constitui um problema evidenciado no HU, principalmente quando se trata da resistência aos carbapenêmicos e em pacientes internados em áreas críticas como as UTI. Dessa forma, o monitoramento e a vigilância para detecção de novos determinantes de resistência aos antimicrobianos são fundamentais para o entendimento dos mecanismos que possam estar associados às altas taxas de resistência obtidas e mantidas para *A. baumannii* neste hospital. O estudo do perfil genotípico de isolados produtores de carbapenemases e o monitoramento da emergência de novos determinantes de resistência são essenciais pois subsidiam a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do HU com dados que possam: direcionar a utilização de antimicrobianos neste hospital; e tomar medidas de controle efetivas para prevenir ou controlar a disseminação destes patógenos multirresistentes no ambiente hospitalar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *Acinetobacter* spp.

Acinetobacter sp. foi descoberto em 1911 pelo microbiologista holandês Beijerinck. Inicialmente designado como *Micrococcus calcoaceticus*, o microrganismo foi isolado a partir do solo em um meio enriquecido com acetato de cálcio. Em 1954, Brisou e Prévot propuseram a classificação do gênero *Acinetobacter* para incluir bactérias Gram-negativas que eram imóveis e não produziam pigmentação (ALMASAUDI, 2016). Entretanto, esta classificação só foi aceita em 1968 a partir de estudos desenvolvidos por Baumann e colaboradores que avaliaram as propriedades bioquímicas e nutricionais de 100 isolados não produtores da enzima citocromo oxidase. Na década de 70 este gênero foi oficialmente reconhecido pelo “Subcommittee on the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria”, onde a primeira espécie a ser listada foi *Acinetobacter calcoaceticus* (PELEG et al., 2006).

O gênero *Acinetobacter* pertencente à família Moraxellaceae possui 56 espécies nomeadas (<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>, último acesso: 16/01/2017) caracterizadas com base na identificação por técnicas moleculares como: sequenciamento do 16S (DNA ribossomal), *rpoB* (RNA polimerase subunidade β), *gyrB* (DNA girase subunidade β); hibridação DNA-DNA; e, até mesmo sequenciamento total do genoma (AL ATROUNI et al. 2016).

Acinetobacter, do grego “*akinetos*” para imóveis, compreendem microrganismos Gram-negativos com morfologia de cocobacilos em fase exponencial de crescimento e possuem tamanho de aproximadamente 1,0 μ m de largura por 2,5 μ m de comprimento. Estes microrganismos possuem versatilidade metabólica, são estritamente aeróbicos, e possuem temperatura ótima de crescimento entre 33°C a 37°C. As principais características metabólicas utilizadas para a identificação deste gênero, incluem: utilização de citrato como fonte de carbono, não fermentação de glicose e lactose, possui a enzima catalase, e não possui as enzimas citocromo oxidase e triptofanase (VISCA et al., 2011; ALMASAUDI, 2016).

O complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* é, até o momento, formado por seis espécies: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii*, e *A. dijkshoorniae*, que constitui um grupo de microrganismos indistinguíveis por métodos bioquímicos convencionais utilizados na

prática clínica (HARDING et al., 2017; GONZALEZ-VILLORIA; VALVERDE-GARDUNO, 2016).

2.2 RESERVATÓRIOS E INFECÇÕES CAUSADAS POR *Acinetobacter* spp.

As espécies do gênero *Acinetobacter* estão amplamente distribuídas na natureza sendo, principalmente, encontradas em solos, água, vegetais, animais, efluentes, e humanos. São considerados microrganismos oportunistas, presentes na microbiota natural da pele, mucosas, e secreções respiratórias, e raramente causam infecções em pacientes saudáveis (AL ATROUNI et al., 2016; ALMASAUDI, 2016). Entretanto, a habilidade de persistir em superfícies inanimadas, a tolerância a dessecação e a persistência em presença de desinfetantes diluídos auxiliam na sobrevivência de *Acinetobacter* spp. no ambiente hospitalar (JAWAD et al., 1998; WISPLINGHOFF et al., 2007; ALMASAUDI, 2016).

Dentre as espécies de *Acinetobacter*, *A. baumannii* é responsável por aproximadamente 80.0% de infecções nosocomiais como: bacteremias, pneumonias, meningites, endocardites, cistites e feridas cirúrgicas, podendo causar surtos de infecções hospitalares. Embora *A. baumannii* corresponda a vasta maioria dos isolados de pacientes internados, cepas multirresistentes pertencentes às outras espécies do complexo *A. baumannii-calcoaceticus* (*A. pittii*, *A. nosocomialis* e *A. calcoaceticus*) também são recuperadas em ambientes hospitalares (NHU et al., 2016; AL ATROUNI et al., 2016). Os fatores de risco associados às infecções por *Acinetobacter* spp. são ventilação mecânica, procedimentos cirúrgicos e invasivos, doenças de base, utilização de agentes antimicrobianos, tempo de internação hospitalar e internação em UTI (DOI et al., 2015).

Em geral, embora *A. baumannii* tenha sido considerado, no passado, como um microrganismo de baixa virulência, na atualidade é reconhecido como um dos principais patógenos hospitalares com importantes fatores de virulência e mecanismos de resistência bem estabelecidos. O aumento da mortalidade devido a infecções causadas por *A. baumannii*, bem como a formidável adaptação em ambiente hospitalar observada mundialmente destacou a necessidade de estudos analisando os determinantes de virulência e resistência que estão associados a sua patogenicidade (OU et al., 2015; LEE et al., 2017).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA E REGULAÇÃO GÊNICA DE *Acinetobacter baumannii*

Os principais fatores de virulência descritos em *Acinetobacter baumannii* incluem: cápsula, lipoligossacarídeos, motilidade, OmpA, formação de biofilme, sistemas de secreção, sistema de aquisição de metais, fosfolipases, e *quorum sensing* (HARDING et al., 2017).

Um dos principais mecanismos de virulência bem estabelecidos em *A. baumannii* é a presença de cápsula. Estudos mostraram que em espécies de *Acinetobacter* foram detectados pelo menos 77 polissacarídeos de superfície diferentes. A cápsula representa um importante fator de virulência pois fornece: proteção contra a entrada de antimicrobianos macromoleculares, como as polimixinas, auxiliando na resistência antimicrobiana; na ativação do sistema complemento e fagocitose auxiliando na evasão do sistema imunológico; e contribui para resistência a dessecação o que permite a permanência deste microrganismo em superfícies inanimadas, como no ambiente hospitalar (EIJKELKAMP et al., 2014; GEISINGER; ISBERG, 2015; HARDING et al., 2017). O lipoligossacarídeos (LOS) presentes em *A. baumannii*, e em outras bactérias Gram-negativas, são constituídos de um oligossacarídeo central e o lipídeo A, com atividade de endotoxina. Diversos estudos mostram a relação de resistência às polimixinas ligada diretamente ao LOS, devido a inserção de fosfoetanolamina ou galactosamina ao lipídeo A, ou mesmo alterações na via biossintética do lipídeo A, que resulta na ausência de LOS na membrana externa (HARDING et al., 2017).

Apesar do gênero *Acinetobacter* ser designado como imóvel, estudos mostraram que as espécies deste gênero podem locomover-se independentemente de flagelo. O mecanismo mais frequente é denominado motilidade tipo “*twitching*”, que ocorre por movimentos de repetição do prolongamento e retração da *pili* tipo IV, prevalentes em *A. baumannii* e *A. nosocomialis* (HARDING et al., 2017; CLEMMER et al., 2011; DE SILVA; KUMAR, 2017).

A OmpA ou Omp38 (**O**uter **m**embrane **p**orin) constitui a maior e mais abundante porina presente na membrana externa em *A. baumannii*. Sua importância como fator de virulência está associada a citotoxicidade e adesão observada em células

eucarióticas; a adesão na formação de biofilme; e a biogênese de vesículas de membrana externa (IYER et al., 2017).

O biofilme corresponde a um dos fatores de virulência que mais dificultam o tratamento de infecções por microrganismos. Isto porque auxilia na sobrevivência dos microrganismos no ambiente hospitalar em superfícies abióticas, como equipamentos médicos e superfícies hospitalares, além de ser extremamente preocupante devido ao prolongamento e possível ineficácia do tratamento antimicrobiano, podendo ocasionar recidivas das infecções. O biofilme consiste de uma população de células bacterianas aderidas a uma superfície (biótica ou abiótica), que são protegidas por uma matriz extracelular, composta de exopolissacarídeos, formando uma barreira contra agentes antimicrobianos, sistema imunológico, desinfetantes, e dessecação. Estudos mostram que devido a sua capacidade de produção de biofilme em equipamentos médicos, *A. baumannii* é uma das espécies bacterianas mais frequente nos hospitais (HARDING et al., 2017; CHIANG et al., 2017).

Os fatores que contribuem para a formação, desenvolvimento e maturação do biofilme em *A. baumannii* incluem: *quorum sensing*, o sistema de dois componentes BfmRS, o *Csu pili*, o *pili* tipo IV, as proteínas de membrana externa Bap, OmpA e Pmt, e a síntese do polissacarídeo poli- β -1,6-acetilglicosamina (PNAG) (EIJKELKAMP et al., 2014; SELASI et al., 2016). As proteínas associadas à aderência no biofilme são OmpA, Bap, *Csu pili*, *pili* tipo IV, e Pmt. Dentre elas, a Bap (***Biofilm associated protein***) constitui uma das principais proteínas de superfície associada a isolados hospitalares envolvidos em surtos. Esta proteína inicialmente detectada em *S. aureus* possui homologia com a Bap detectada em *A. baumannii* e em outras espécies como *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. A importância da Bap se deve, principalmente, a capacidade de aderência a superfícies abióticas, como poliestireno, titânio e vidro, e aderência a células eucarióticas (BROSSARD; CAMPAGNARI, 2011; GOH et al., 2013; HARDING et al., 2017).

Os sistemas de secreção são importantes fatores para a aquisição de nutrientes e patogenicidade de muitos microrganismos pois agem liberando enzimas hidrolíticas, proteínas, e toxinas no ambiente, no hospedeiro, ou até mesmo em outros microrganismos competidores. Os sistemas relatados em *A. baumannii*, incluem: os sistemas de secreção do tipo II (SST2) e tipo VI (SST6), a *Acinetobacter trimeric autotransporter adhesin* (Ata), e as vesículas de membrana externa (***Outer membrane***

vesicles – OMVs). Algumas proteínas efetoras secretadas pelo SST2 descritas em *A. baumannii* são: LipA e LipH com atividade de lipases, e CpaA que possui capacidade de degradar fibrinogênio e fator V da cascata de coagulação (JOHNSON et al., 2016; WEBER et al., 2017; JHA et al., 2017).

Contrário ao SST2, o SST6 está presente em muitas bactérias Gram-negativas e sua função é promover a morte de outras bactérias competidoras se ligando a elas e injetando toxinas letais. Estudos mostram que alguns efetores com atividade na morte celular são a nuclease Tde, a proteína Tdi, e a peptidase TagX que cliva as ligações de L-Ala e D-Glu do peptideoglicano (WEBER et al., 2017).

A Ata é uma proteína transportadora localizada na membrana externa pertencente ao sistema de secreção do tipo V e, possivelmente, é expressa em todos os isolados de *A. baumannii* estando associada a adesão ao colágeno tipo III, IV, e V, e a várias superfícies inanimadas, auxiliando na formação de biofilme (JOHNSON et al., 2016; JHA et al., 2017).

Um mecanismo diferente dos sistemas de secreção descritos acima são as OMVs, que são compartimentos formados e secretados pela membrana externa. Estas vesículas podem conter diversas proteases, fosfolipases e hemolisinas, devido a liberação de proteínas da membrana externa, do espaço periplasmático, da membrana plasmática, do citosol, e inclusive, plasmídeos que podem ser transferidos por transformação para espécies bacterianas naturalmente competentes. Em *A. baumannii* as OMVs também atuam na diminuição da concentração de β -lactâmicos extracelular por liberação de β -lactamases em grande quantidade. Embora encontrada em muitas bactérias Gram-negativas, o mecanismo de formação das OMVs ainda necessita ser esclarecido (JOHNSON et al., 2016; WEBER et al., 2017; JHA et al., 2017).

A aquisição de metais como ferro e zinco são essenciais para diferentes processos fisiológicos dos organismos. Em *A. baumannii*, moléculas quelantes de metais conhecidas como sideróforos são o principal mecanismo para a aquisição de ferro e zinco. O sistema de aquisição de ferro mais importante em *A. baumannii* é por meio do sideróforo acinetobactin, e do zinco é decorrente do sideróforo calprotectin (KROGER et al., 2016; HARDING et al., 2017).

Para a aquisição de nutrientes presentes dentro da célula do hospedeiro, microrganismos podem liberar enzimas hidrolíticas de fosfolipídios de membrana chamadas fosfolipases. Estas enzimas causam citólise por vários

mecanismos diferentes e são agrupadas dependendo do sítio de clivagem. A fosfolipase A hidrolisa ácidos graxos das caudas apolares; a fosfolipase C cliva a ligação do glicerol com o grupo fosfato; e a fosfolipase D cliva a ligação do grupo fosfato com o grupo orgânico. As fosfolipases detectadas em *A. baumannii* são a C e D (FIESTER et al., 2016; STAHL et al., 2015). Em estudo desenvolvido por Fiester et al. (2016), a fosfolipase C em *A. baumannii* mostrou atividade hemolítica em eritrócitos de humanos e equinos em ambiente com deficiência de ferro, indicando que sua expressão pode ser regulada por sistemas de aquisição de ferro. Stahl et al. (2015) observaram que a expressão de fosfolipase D por *A. baumannii* contribui para invasão de células epiteliais pulmonares humanas, demonstrando a importância desta fosfolipase na patogênese da bactéria.

O *quorum sensing* constitui um mecanismo de comunicação inter- e intra-espécies por meio de moléculas autoindutoras de sinalização, chamadas de N-acil homoserina lactona (AHL). A capacidade de percepção da comunidade bacteriana promove vantagens que permitem às bactérias coordenar a regulação de sistemas fisiológicos e alterar a expressão gênica de acordo com a necessidade do ambiente. Isto porque, estudos mostraram o envolvimento das AHL principalmente na replicação, formação de biofilme e produção de fatores de virulência, conjugação, e motilidade (HOW et al., 2015).

Os sistemas de dois componentes são responsáveis pela regulação da expressão ou repressão gênica de fatores de virulência e resistência em resposta a alterações e estresse no ambiente. Estes sistemas são altamente conservados entre as espécies e são formados pelo sensor com atividade de quinase localizado na membrana citoplasmática que reconhece as alterações fisiológicas e reage promovendo a fosforilação do regulador de resposta que atua na expressão ou repressão de certos genes. Os sistemas de dois componentes mais estudados em *A. baumannii* são BfmSR, PmrAB, AdeSR, BaeSR, e GacSA; entretanto, já foram detectados 21 sistemas em um isolado clínico multirresistente na Índia (KROGER et al., 2016; SARANATHAN et al., 2017). O BfmSR é um sistema importante para a produção de *pili* tipo IV e formação de biofilme pois controla a expressão do *operon csu*, e está associado também com a regulação da morfologia celular e na regulação do *locus* K. A resistência às polimixinas é uma das mais importantes funções de regulação do PmrAB (*Polymyxin resistance*) em *A. baumannii*. O AdeSR está associado a regulação da formação de biofilme, fatores de virulência, sistema de

efluxo AdeABC, e relacionado direta ou indiretamente na regulação de 579 genes. O BaeSR está associado, principalmente, a regulação dos sistemas de efluxo AdeABC, AdeIJK e MacAB-TolC. Recentemente detectado, o GacSA constitui um dos principais sistemas de dois componentes em *A. baumannii* que regula 674 genes envolvidos em virulência, resistência e metabolismo (KROGER et al., 2016).

2.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *Acinetobacter baumannii*

2.4.1 DEFINIÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA

Na atualidade, a classificação amplamente utilizada como referência para as definições de resistência foi publicada em 2011 a partir de uma iniciativa do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). Um comitê mundial de especialistas em resistência antimicrobiana estabeleceu as definições de resistência entre os principais patógenos bacterianos. As classes de antimicrobianos a serem utilizadas no tratamento de *Acinetobacter* spp. segundo Magiorakos et al., 2012 estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1 - Classes de antimicrobianos utilizados para o tratamento de *Acinetobacter* spp.

Classes de antimicrobianos	Agentes antimicrobianos
Penicilinas + Inibidores de β-lactamases	Ampicilina-sulbactam
Penicilinas Antipseudomonas + Inibidores de β-lactamases	Piperacilina-tazobactam Ticarcilina-ácido cluvulânico
Cefalosporinas de Espectro Extendido	Cefotaxima Ceftriaxona Ceftazidima Cefepime Imipenem
Carbapenêmicos	Meropenem Doripenem
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina Levofloxacina Amicacina
Aminoglicosídeos	Gentamicina Tobramicina
Inibidores da via do folato	Sulfametoxazol-trimetoprim
Tetraciclinas	Tetraciclina Doxiciclina Minociclina
Polimixinas	Polimixina B Colistina

Fonte: MAGIORAKOS et al., 2012.

A partir desta classificação foi possível a determinação da resistência dos isolados de *Acinetobacter* spp. que seguiu os seguintes critérios:

- Isolados multirresistentes (MR): apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano dentre três classes estabelecidas e utilizadas no tratamento das infecções por este microrganismo;
- Isolados extensivamente resistentes (ER): apresentam resistência à pelo menos um antimicrobiano dentre sete ou mais classes, mas no

caso de resistência a todas as classes apresentam sensibilidade a pelo menos um antimicrobiano dentre todas as classes;

- Isolados pan-resistentes (PR): apresentam resistência a todos os antimicrobianos disponíveis para o tratamento das infecções por *Acinetobacter* spp. (MAGIORAKOS et al., 2012).

2.4.2 IMPACTO CLÍNICO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

No início da década de 70, os isolados clínicos de *A. baumannii* apresentavam sensibilidade à várias classes de antimicrobianos, realidade diferente observada atualmente. Hoje, este microrganismo encontra-se entre os principais patógenos responsáveis por infecções hospitalares, sendo que, a aquisição de MR em isolados de *A. baumannii* é considerada um dos principais desafios enfrentados nas instituições de saúde, de acordo com a OMS (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; WHO, 2015).

O uso extensivo de antimicrobianos nos ambientes hospitalares levou à emergência de isolados MR que causam infecções com altos índices de mortalidade, principalmente em pacientes internados nas UTI (DOI et al., 2015). Este fator é de grande preocupação pois isolados clínicos de *A. baumannii* podem ser responsáveis por índices elevados de mortalidade atribuída (cerca de 40.0%) principalmente em pacientes que receberam terapia inicial inadequada dentro dos primeiros 14 dias de tratamento (GU et al., 2016). Gu e colaboradores (2016) avaliaram que *A. baumannii* isolados de hemocultura de pacientes que foram a óbito apresentaram características de resistência alarmantes: 98.0% foram multirresistentes e apresentaram resistência aos carbapenêmicos. Neste estudo verificou-se, ainda, que somente 4.1% dos pacientes receberam terapia antimicrobiana apropriada.

A alta frequência de isolados clínicos de *A. baumannii* MR dificulta arduamente o tratamento das infecções causadas por este patógeno. O ambiente hospitalar representa um local de evolução da RA dos isolados clínicos exercida pela pressão seletiva sobre os mesmos. A aquisição de diversos genes de resistência bem como o arsenal de fatores de virulência encontrados nestes isolados estão associados ao sucesso na disseminação de clones epidêmicos mundiais. Em *A. baumannii* a

plasticidade genética e a adaptação a ambientes de estresse celular são hipóteses que explicam o sucesso da disseminação destes clones (VISCA et al., 2011). De acordo com os esquemas desenvolvidos pela Universidade de Oxford e pelo Instituto Pasteur para o MLST (*multilocus sequence typing*), os quatro complexos clonais de *A. baumannii* disseminados mundialmente e frequentes no Brasil são: CC113/79, CC109/1, CC110/25, CC103/15, e CC118/2 (MARTINS et al., 2016;). Um método rápido e confiável para a detecção destes clones pode ser realizado pelo Trilocus sequence-based multiplex-PCR (MARTINS et al., 2016; VASCONCELLOS et al., 2017). Este método diferencia os principais complexos clonais baseado nas diferenças na sequência de nucleotídeos dos genes constitutivos de *A. baumannii* *csuE*, *bla_{OXA-51}*, e *ompA* por meio de uma única PCR multiplex (MARTINS et al., 2016).

2.4.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *Acinetobacter baumannii*

Em geral, nos BGN, a RA é decorrente de mecanismos intrínsecos e adquiridos como: hiperprodução de sistemas de efluxo, perda ou modificação de porinas, modificação do sítio alvo do antimicrobiano, alterações de vias metabólicas, mutação em genes codificadores de componentes dos LOS, modificação e/ou mutação do sítio alvo do antibiótico e produção de enzimas que alteram a estrutura ou hidrolisam o antibiótico (Figura 1) (BLAIR et al., 2016).

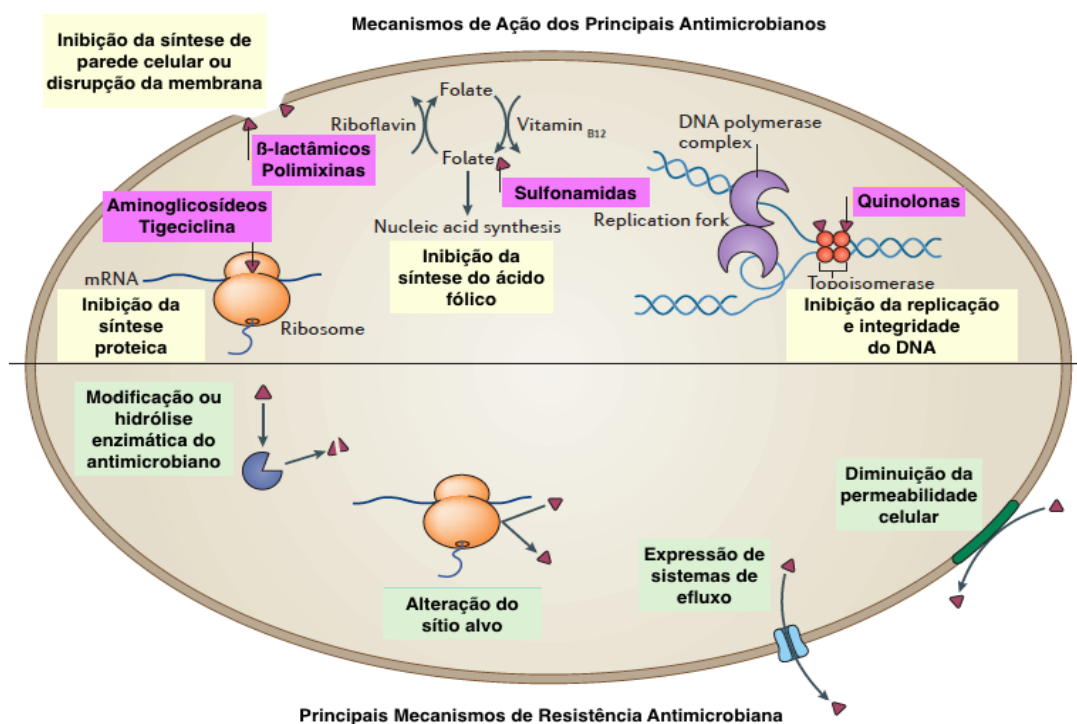


FIGURA 1 - Mecanismos de ação e resistência aos principais antimicrobianos.

Fonte: CROFTS et al. (2017), adaptado.

As espécies de *Acinetobacter* possuem naturalmente alguns destes mecanismos de resistência sendo, desta forma, intrinsecamente resistentes a uma variedade de antimicrobianos. O complexo *A. baumannii-calcoaceticus*, por exemplo, possui resistência intrínseca à ampicilina, amoxicilina, aztreonam, ertapenem, trimetoprim, cloranfenicol e fosfomicina devido a baixa permeabilidade celular, presença de diversos sistemas de efluxo e enzimas hidrolíticas intrínsecas, como a OXA-51 em *A. baumannii* (CLSI, 2016; IYER et al., 2017)

A aquisição de plasmídeos contendo genes de resistência obtidos principalmente por conjugação bacteriana é um dos principais mecanismos associados a RA em *A. baumannii* (ALMASAUDI, 2016; PAGANO et al., 2016b). O acúmulo de vários determinantes de resistência em único isolado é comum, originando cepas MR, ER e até PR (BLAIR et al. 2014). Estes fenótipos de resistência podem ser decorrentes da alta plasticidade genômica das espécies de *Acinetobacter*, especialmente *A. baumannii*, que permite a aquisição de elementos genéticos móveis localizados em ilhas genômicas de resistência; acumulando assim, uma diversidade

de genes codificadores de resistência a uma ampla variedade de classes de antimicrobianos (PAGANO et al., 2016b).

Um estudo realizado na França com um único isolado clínico de *A. baumannii* epidêmico no país detectou a presença de 45 genes de resistência, em uma ilha de resistência neste microrganismo. Estes, provavelmente, foram adquiridos de *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. ou *E. coli*, evidenciando a importância da pressão seletiva exercida no ambiente hospitalar que favorece a transferência horizontal de genes entre patógenos. Dentre os 45 genes de resistência detectados, 25 codificaram resistência a vários antimicrobianos (FOURNIER et al., 2006).

A classificação de *A. baumannii* como um dos principais patógenos causadores de infecções hospitalares é decorrente da plasticidade e variabilidade genética que apresenta em situações de estresse celular provocado pelo ambiente ao qual se encontra (OH et al. 2017). Em situações desfavoráveis ocasionadas pela presença de antimicrobianos, a aquisição de resistência por mutações ou por elementos genéticos móveis representam as principais causas de resistência adquirida em bactérias patogênicas, como *A. baumannii*. Os elementos genéticos móveis que incluem sequências de inserção (IS), transposons, integrons ou plasmídeos resultam geralmente na aquisição de resistência a múltiplos antimicrobianos e são extremamente preocupantes devido a possibilidade de disseminação desses elementos por transferência horizontal de genes (CAG et al., 2016; IYER et al., 2017).

2.4.3.1 SEQUÊNCIAS DE INSERÇÃO

As IS são sequências repetidas invertidas no DNA que flanqueiam, possivelmente, um gene de resistência aos antimicrobianos e uma transposase, uma recombinase que faz a mobilização da sequência de DNA presente entre as IS. As IS compreendem a forma mais simples e mais comum de elementos genéticos móveis e, em geral, variam de 700bp a 2.500bp (SIGUIER et al., 2015). Em *A. baumannii*, as IS estão muito associadas a expressão de genes de resistência aos antimicrobianos e relacionados a virulência, e podem ser mobilizados do plasmídeo para o cromossomo e do cromossomo para o plasmídeo representando uma fonte de recombinação genética (OH et al., 2017). A estrutura da IS está representada na Figura 02.



FIGURA 2 - Estrutura de sequências de inserção.

FONTE: SIGUIER et al., 2015.

A IS*Aba1* (*Insertion Sequence Acinetobacter baumannii* 1) é frequente em *A. baumannii* por atuar como promotor dos genes de resistência intrínsecos *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{AmpC}, e dos genes adquiridos *bla*_{OXA-23-like} e *bla*_{OXA-58}. Outras IS encontradas em *A. baumannii* relacionadas a RA incluem: IS*Aba2*, IS*Aba3*, IS*Aba4*, IS*Aba125*, IS*Aba825* (OH et al., 2017). O IS*Aba11* está associado a resistência as polimixinas e virulência em *A. baumannii* pois são inseridas dentro da sequência dos genes da via biossintética do lipídeo A causando a disrupção do gene e interrupção da produção do lipídeo A (ALMASAUDI, 2016).

2.4.3.2 TRANSPOSONS

Os transposons consistem em elementos mais complexos de IS. Eles apresentam as IS repetidas em suas extremidades e a transposase, mas diferem em sua estrutura por possuírem vários genes associados, incluindo, possivelmente, um integron (CAG et al., 2016). Os transposons relacionados ao gene *bla*_{OXA-23-like} são frequentemente encontrados em isolados clínicos de *A. baumannii*, e são associados a disseminação global deste gene. Os transposons detectados em *A. baumannii* associados a mobilização e aumento da expressão do *bla*_{OXA-23-like} incluem: Tn2006, Tn2007, Tn2008, e Tn2009, e destes somente o Tn2007 não é flanqueado por IS*Aba1*. Estes transposons já foram detectados em plasmídeos e no cromossomo, indicando a importância da mobilização por este elemento genético móvel (CHEN et al., 2017). Hua e colaboradores (2016) verificaram que além da transferência, os transposons podem se replicar e produzir múltiplas cópias de sua estrutura sendo inserido em diversas regiões do genoma e aumentando a expressão do *bla*_{OXA-23-like}.

2.4.3.3 INTEGRONS

Os integrons apresentam estrutura diferente das IS e transposons. A estrutura básica de um integron possui uma sequência de nucleotídeos que codifica uma recombinase chamada de integrase (*intI*) que reconhece os sítios *attI* e *attC*, uma sequência promotora Pc, e genes cassetes. Os integrons são divididos em classes de acordo com a sequência de aminoácidos que compõem a integrase, e por sua composição e estrutura diferentes. Embora várias classes sejam conhecidas, o integron mais frequentemente detectado em isolados clínicos é o integron de classe 1. Este integron possui estruturas conservadas na extremidade 5'-CS constituído por uma integrase, um sítio promotor (Pc), e um sítio de reconhecimento *attI*; e na extremidade 3'-CS composto pelos genes *qacE* e *sul1*, como mostrado na Figura 3 (DENG et al., 2015).



FIGURA 3 - Estrutura de um integron de classe 1.

FONTE: LABBATE et al., 2009.

Os genes cassetes são constituídos por uma sequência codificante, geralmente envolvendo resistência a antimicrobianos, e o sítio *attC*, uma sequência de 59 bp que possibilita o reconhecimento pela integrase ocasionando em excisão ou introdução de genes na estrutura do integron. Os sítios de reconhecimento da integrase para a introdução do cassete com o integron são o *attI* (no integron) e *attC* (no cassete). Por poderem conter vários genes cassetes em sua estrutura, os integrons são associados a múltipla resistência aos antimicrobianos, em especial resistência por metalo- β -lactamases e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. A sequência promotora Pc confere a expressão dos genes cassetes e pode variar os níveis de expressão de acordo com a sua sequência e a quantidade de promotores presentes. Diversas variantes de Pc foram descritas e diferem em sua atividade promotora, assim como, a expressão dos genes cassetes pode aumentar pela presença de mais de um promotor (LABBATE et al., 2009).

2.4.3.4 PLASMÍDEOS

Os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossomais circulares e autoreplicativas compostas de genes acessórios que auxiliam na adaptação e persistência a ambientes adversos, não sendo genes essenciais para a sobrevivência bacteriana. Plasmídeos servem como veículo de transporte de IS, transposons, e integrons e são transferidos por conjugação, transdução ou transformação. A conjugação bacteriana constitui a transferência horizontal de plasmídeos mais importante, embora dependa de uma maquinaria própria para a produção do *pilus* conjugativo (HALL et al., 2017). Em *A. baumannii*, 19 plasmídeos detectados em isolados clínicos são utilizados como um método de tipagem e epidemiologia molecular pois são característicos em surtos de infecção por isolados multirresistentes (BERTINI et al., 2010).

2.4.3.5 RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS

Os carbapenêmicos são antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro, inseridos na prática clínica em 1985. Estes antimicrobianos possuem atividade bacteriostática por inibirem a síntese da parede celular ao serem utilizados como substratos pelas transpeptidases PBPs (*penicillin binding-proteins*) e impedirem a ligação D-alanina-D-alanina do ácido acetilmurâmico do peptidoglicano (BONOMO, 2016). Carbapenêmicos são os fármacos de escolha utilizados no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* MR, que podem apresentar resistência a antimicrobianos como: penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina (DOI et al., 2015).

Os mecanismos frequentemente envolvidos na resistência aos carbapenêmicos envolvem a diminuição na permeabilidade da membrana externa a estes fármacos por perda ou modificação de porinas, principalmente a CarO; a hiperprodução de sistemas de efluxo que exportam estes fármacos para fora da célula bacteriana, como AdeABC e AdeIJK; a inativação do antibiótico por presença de β -lactamases; e, por último, embora um mecanismo menos comum e ainda não bem documentado, incluem as alterações ou modificações das PBPs (XIAO, 2016; MELETIS, 2016, PAGANO et al., 2016b, VILA-FARRÉS et al., 2015). Destes, o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos clinicamente mais significativo é a

hidrólise enzimática do anel β -lactâmico devido à presença de β -lactamases. Isto porque, estas enzimas são altamente estáveis, conferem resistência a todos, ou quase todos os β -lactâmicos e estão presentes em elementos genéticos móveis transferíveis entre espécies bacterianas. Mais de 2.000 β -lactamases são conhecidas, embora as mais preocupantes sejam as carbapenemases, enzimas que degradam carbapenêmicos além de outros β -lactâmicos (BONOMO, 2016; MELETIS, 2016).

Devido à importância e diversidade das β -lactamases, vários esquemas para estabelecer a classificação destas enzimas estão descritos. As duas principais classificações incluem: a classificação de Bush-Jacob-Medeiros (1995), que agrupa as enzimas de acordo com suas propriedades funcionais, e a classificação de Ambler (1980), que as agrupa de acordo com as propriedades moleculares que apresentam. A classificação de Ambler é amplamente utilizada para diferenciar as β -lactamases e estabelece quatro classes agrupadas de acordo com: ponto isoelétrico, massa molecular, atividade enzimática, interação com os inibidores e inativadores, natureza do sítio ativo, sequência dos aminoácidos, e estrutura tridimensional (AMBLER, 1980). A classificação das principais β -lactamases estão apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 - Principais carbapenemases em *A. baumannii* de acordo com a classificação de Ambler.

Classe	Características	Carbapenemases detectadas em <i>Acinetobacter</i> spp.
A	Corresponde principalmente às β -lactamases de espectro ampliado, penicilinases e carbenicilinases	GES KPC
B	Metalo- β -lactamases	GIM IMP NDM SIM VIM
C	Cefalosporinases intrínsecas e adquiridas	-
D	Oxacilinases	OXA-23-like OXA-24/40-like OXA-51-like OXA-58-like OXA-143-like OXA-235-like

FONTE: LEE et al., 2017; KAASE et al., 2013.

Os carbapenêmicos são amplamente utilizados no tratamento das infecções causadas por patógenos MR por permanecerem estáveis frente à maioria das β -lactamases produzidas. Atualmente, em *A. baumannii* observa-se que a resistência aos carbapenêmicos está associada a resistência a várias outras classes de outros antimicrobianos, conservando, em geral, apenas a sensibilidade à tigeciclina e às polimixinas (GONZALEZ-VILLORIA E VALVERDE-GARDUNO, 2016; MELETIS, 2015).

Após 2006, verificou-se a emergência de surtos de infecção por *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos em vários países dos diferentes continentes, dentre eles: Brasil, Argentina, Estados Unidos, Portugal, Espanha, França, China e Japão, sendo a produção de carbapenemases o principal mecanismo

de resistência observado. Os determinantes de resistência aos carbapenêmicos mais comumente detectados e adquiridos em *Acinetobacter* spp. são as *Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase* (CHDL) codificadas pelos genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24/40-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like} e *bla*_{OXA-235-like}. Outras carbapenemases de grande importância, embora menos frequentes que as CHDL em *Acinetobacter* spp., incluem as metalo-beta-lactamases pertencentes a classe B de Ambler, principalmente os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM-1}, e *bla*_{NDM}, e os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{GES} pertencentes a classe A de Ambler (ZHAO; HU, 2015; XIAO et al. 2016; KARAH et al., 2016; PAGANO et al., 2016a).

2.4.3.5.1 CHDL - CARBAPENEM-HYDROLYZING CLASS D B-LACTAMASES

As CHDL ou OXA-carbapenemases são β -lactamases que pertencem a classe D de Ambler, possuem o aminoácido serina em seu sítio ativo. Estas enzimas têm a capacidade de hidrolisar penicilinas, principalmente oxacilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas de espectro limitado, mas não possuem atividade em cefalosporinas de amplo-espectro e não são inibidas por ácido clavulânico (HIGGINS et al., 2009; POIREL et al., 2010; ANTUNES; FISHER 2014). São conhecidas mais de 510 variantes nesta classe que apresentaram $\geq 80.0\%$ de homologia na sequência de aminoácidos; sendo classificadas num mesmo grupo filogenético, as variantes que apresentam $\geq 90.0\%$ de homologia na sequência de aminoácidos (ANTUNES; FISHER 2014). As CHDL de maior importância em *Acinetobacter* spp. são divididas em cinco grupos filogenéticos e estão representadas na Tabela 3.

TABELA 3 - Variantes enzimáticas das *Carbapenem-Hydrolyzing*

Class D β-lactamase.

Grupo Filogenético	Variantes
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133, OXA-146, OXA-165, OXA-166, OXA-167, OXA-168, OXA-169, OXA-170, OXA-171, OXA-225, OXA-239, OXA-366, OXA-398, OXA-422, OXA-423, OXA-435, OXA-440, OXA-482, OXA-483
<i>bla</i> _{OXA-24/40-like}	OXA-24/40, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-33, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207, OXA-437
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	OXA-51, OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-67, OXA-68, OXA-69, OXA-70, OXA-71, OXA-75, OXA-76, OXA-77, OXA-78, OXA-79, OXA-80, OXA-82, OXA-83, OXA-84, OXA-86, OXA-87, OXA-88, OXA-89, OXA-90, OXA-91, OXA-92, OXA-93, OXA-94, OXA-95, OXA-98, OXA-99, OXA-100, OXA-104, OXA-106, OXA-107, OXA-108, OXA-109, OXA-110, OXA-111, OXA-112, OXA-113, OXA-115, OXA-117, OXA-120, OXA-121, OXA-122, OXA-123, OXA-124, OXA-125, OXA-126, OXA-127, OXA-128, OXA-130, OXA-131, OXA-132, OXA-138, OXA-144, OXA-148, OXA-149, OXA-150, OXA-172, OXA-173, OXA-174, OXA-175, OXA-176, OXA-177, OXA-178, OXA-179, OXA-180, OXA-194, OXA-195, OXA-196, OXA-197, OXA-200, OXA-201, OXA-202, OXA-203, OXA-204, OXA-206, OXA-208, OXA-216, OXA-217, OXA-219, OXA-223, OXA-234, OXA-241, OXA-242, OXA-248, OXA-249, OXA-250, OXA-254, OXA-259, OXA-260, OXA-261, OXA-262, OXA-263, OXA-312, OXA-313, OXA-314, OXA-315, OXA-316, OXA-317, OXA-336, OXA-337, OXA-338, OXA-339, OXA-340, OXA-341, OXA-342, OXA-343, OXA-344, OXA-345, OXA-346, OXA-365, OXA-371, OXA-374, OXA-375, OXA-376, OXA-377, OXA-378, OXA-379, OXA-380, OXA-381, OXA-382, OXA-383, OXA-384, OXA-385, OXA-386, OXA-387, OXA-388, OXA-389, OXA-390, OXA-391, OXA-400, OXA-401, OXA-402, OXA-403, OXA-404, OXA-406, OXA-407, OXA-408, OXA-409, OXA-411, OXA-412, OXA-413, OXA-414, OXA-424, OXA-425, OXA-426, OXA-429, OXA-430, OXA-431, OXA-432, OXA-433, OXA-441, OXA-442, OXA-480, OXA-497, OXA-507, OXA-508, OXA-509, OXA-516
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	OXA-58, OXA-96, OXA-97, OXA-164, OXA-397, OXA-420, OXA-512
<i>bla</i> _{OXA-143-like}	OXA-143, OXA-182, OXA-231, OXA-253, OXA-255, OXA-499
<i>bla</i> _{OXA-235-like}	OXA-235

FONTE: POIREL et al., 2010; OPAZO et al., 2012; ANTUNES; FISHER, 2014; LEE et al., 2017; D'SOUZA et al., 2017; <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 26/02/2018.

Uma carbapenemase de relevante importância é a OXA-51 codificada pelo gene *bla*_{OXA-51-like}, utilizado como marcador genético da espécie *A. baumannii* por ser intrínseca desta espécie (TURTON et al. 2006). Este gene possui baixa atividade hidrolítica contra carbapenêmicos, mas quando associado à ISAb1 esta pode promover o aumento da expressão da resistência aos carbapenêmicos, alcançando uma concentração inibitória mínima (CIM) até oito vezes maior, principalmente contra meropenem (ALAEI et al., 2016).

No Brasil, a disseminação de isolados de *Acinetobacter* spp. produtores de OXA-23-like está relacionada às elevadas taxas de resistência aos carbapenêmicos (CLÍMACO et al., 2013). Em *A. baumannii* foi identificado que este gene pode estar associado a ISAb1, uma sequência de inserção com atividade promotora, uma vez que está frequentemente associada ao aumento da expressão dos genes codificadores de CHDL (VIANA et al., 2016).

Outra CHDL recentemente detectada no Brasil foi a *bla*_{OXA-58}. Embora em baixas frequências, este gene já foi detectado em isolados clínicos de *A. baumannii* no Rio de Janeiro, Porto Alegre, e Goiás (FIGUEIREDO et al., 2011; GUSATTI et al., 2012; CASTILHO et al., 2017).

Um estudo que avaliou isolados de *A. baumannii* provenientes das cinco regiões do Brasil detectou a ampla distribuição dos genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51-like} em todos estes locais. No estado de São Paulo, houve também, a detecção de *A. baumannii* contendo *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-72} em três hospitais avaliados indicando uma possível transmissão inter-hospitalar destes genes (VASCONCELOS et al., 2015). O gene *bla*_{OXA-72} (variante do *bla*_{OXA-24/40-like}), inicialmente detectado em São Paulo, foi descrito também em Pernambuco (CAVALCANTI et al., 2013), Paraná e Rio Grande do Sul (PAGANO et al., 2016a; PAGANO et al., 2016b). Embora, o gene *bla*_{OXA-72} apresente disseminação em algumas regiões do Brasil, a segunda CHDL mais frequentemente detectada em *A. baumannii* neste país é o *bla*_{OXA-143-like} (PAGANO et al., 2016b). A primeira descrição deste gene ocorreu em 2009 em um isolado de *A. baumannii* recuperado de hemocultura proveniente de um paciente internado na UTI em um hospital no Brasil (HIGGINS et al., 2009). Desde então, as variantes do grupo *bla*_{OXA-143-like} descritos no Brasil são: o gene *bla*_{OXA-143} em São Paulo e Rio de Janeiro; o gene *bla*_{OXA-231} detectado em Londrina (GIONCO et al., 2012); e o gene *bla*_{OXA-253} em Recife (CAVALCANTI et al., 2016) e Belo Horizonte (GIRLICH et al., 2014). Em um estudo multicêntrico no sudeste do Brasil, Clímaco e colaboradores (2013)

avaliaram 67 isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, e identificaram que 71.6% dos isolados apresentaram o gene *bla*_{OXA-23}, e 25.4% o gene *bla*_{OXA-143}. Estes autores sugeriram que houve uma disseminação destes determinantes de resistência por transferência horizontal entre diferentes clones deste microrganismo. Embora, diversos estudos mostraram que *bla*_{OXA-23-like} seja a CHDL adquirida mais frequente nos isolados de *A. baumannii* no Brasil, outros estudos mostraram alta prevalência de *bla*_{OXA-143-like} dentre os isolados clínicos recuperados de alguns hospitais em São Paulo (ANTONIO et al., 2011; MOSTACHIO et al., 2012).

2.4.3.5.2 METALO-BETA-LACTAMASES

As metalo-beta-lactamases (MBLs) são conhecidas por apresentarem em seu sítio ativo um metal divalente como cofator para sua ação, geralmente o Zn²⁺. Estas enzimas não são inibidas por inibidores de β-lactamases e conferem resistência a todos os β-lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos (ZHAO; HU, 2015; POTRON et al., 2015). As MBLs foram inicialmente detectadas em 1966 na espécie *Bacillus cereus* como uma cefalosporinase dependente de zinco que era inibida por EDTA (SABATH; ABRAHAM, 1966). Desde então, 38 famílias de MBLs foram relatadas em Gram-negativos sendo que as MBLs adquiridas incluem IMP, VIM, NDM, SPM, GIM, SIM, DIM, KHM, TMB, FIM and AIM (ZHAO; HU, 2015). Dentre estas, as principais MBLs detectadas em *Acinetobacter* spp. são IMP (*Imipenemase*), VIM (*Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*), GIM (*German Imipenemase*), SIM (*Seoul metallo-beta-lactamase*), e NDM (*New Delhi metallo-beta-lactamase*) (WATANABE et al., 1991; LAURETTI et al., 1999; POIREL et al., 2000; CASTANHEIRA et al., 2004; YONG et al., 2009; ZHAO; HU, 2015). Segundo o Banco de Dados do NCBI (último acesso: 26/02/2018) existem diversas variantes relatadas para os genes *bla*_{IMP} (IMP-1 até IMP-58), *bla*_{VIM} (VIM-1 até VIM-51), *bla*_{GIM} (GIM-1 e GIM-2), e *bla*_{NDM} (NDM-1 até NDM-16).

Mundialmente, as MBLs mais frequentemente detectadas em *A. baumannii* são da família IMP, variantes IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-8, IMP-11, e IMP-19, que já foram detectados na Itália, Japão, Coréia do Norte, Índia, Cingapura, Hong Kong, Portugal, Brasil, e China. A segunda MBL mais identificada em *A. baumannii* é a NDM, principalmente as variantes NDM-1 e NDM-2, com relatos no Egito, Israel, Emirados Árabes, Índia, Alemanha, Suíça, Algeria, Bélgica,

Bangladesh, República Tcheca, China, e Líbia. As outras MBLs já relatadas em *A. baumannii* embora menos frequentes incluem: as variantes VIM-1, VIM-2, VIM-3, VIM-4, e VIM-11, encontradas na Coreia do Norte, Grécia, e Taiwan; a SIM-1 com relatos na Coreia do Sul e China; e a GIM-1 com relato na Alemanha (ZARRILLI et al., 2013; MATHLOUTHI et al., 2016; PAGANO et al., 2016b; KAASE et al., 2013).

2.4.3.5.3 KPC

A enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) foi primeiramente reportada em 2001 nos Estados Unidos, sendo codificada pelo gene *bla_{KPC-1}*, contendo 879bp e codificando 293 aminoácidos. Este gene, inicialmente detectado em um plasmídeo de 50kb, foi classificado pertencente à classe A de Ambler por possuir as sequências de aminoácidos serina-serina-fenilalanina-lisina e lisina-treonina-glicina que são características deste grupo de carbapenemases (Yigit et al., 2001). Atualmente, 23 variantes enzimáticas deste gene (KPC-2 à KPC-24) foram relatadas (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 26/02/2018). O gene *bla_{KPC}* apresenta alta relevância mundial, especialmente entre os BGN da família Enterobacteriaceae, e constituem fatores alarmantes no ambiente hospitalar devido a disseminação deste gene, principalmente por plasmídeos, entre as espécies bacterianas (NAAS et al., 2008). Embora não seja frequente em *Acinetobacter* spp. no Brasil, o gene *bla_{KPC}* é amplamente disseminado entre membros da família Enterobacteriaceae e, também, relatado em isolados de *P. aeruginosa* tanto em amostras clínicas como em efluentes (CAMPOS et al., 2016; CARRARA-MARRONI et al., 2015; MIRANDA et al., 2015; PICÃO et al., 2013).

Em *Acinetobacter* spp., o gene *bla_{KPC}* foi primeiramente descrito em Porto Rico, por Robledo et al. (2010). Estes pesquisadores identificaram 10 isolados de *Acinetobacter* spp. que apresentaram o gene *bla_{KPC}*, e que codificaram enzimas KPC-2, KPC-3, KPC-4 e uma nova variante, a KPC-10. Em todos os hospitais analisados onde detectou-se *Acinetobacter* spp. produtor de KPC, verificou-se também, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae* carreando o mesmo gene, mostrando a disseminação do mesmo entre diferentes patógenos (ROBLEDO et al., 2010). No Brasil, *bla_{KPC-2}* e *bla_{KPC-3}* foram detectados em isolados clínicos de *A. baumannii* em hospitais de São Luís no Maranhão (RIBEIRO et al., 2016).

2.4.3.5.4 GES

Descrito na França em 2000 por Poirel et al. (2000), o gene que codifica a enzima GES (*Guiana Extended Spectrum beta-lactamase*) foi primeiramente detectado em um isolado de *K. pneumoniae* recuperado de uma criança transferida da Guiana Francesa. O gene *bla_{GES}* codificou uma enzima classificada na classe A de Ambler por apresentar sequências de aminoácidos características deste grupo. O primeiro gene descrito continha 864bp que codificou uma β -lactamase de 288 aminoácidos, com atividade hidrolítica em penicilinas e cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações tendo a ceftazidima como principal substrato, e sendo inibida por inibidores de β -lactamases (Poirel et al., 2000). Existem, até o momento, 31 variantes descritas, embora somente as variantes GES-1, GES-2, GES-4, GES-5, GES-11 e GES-14 possuam atividade em carbapenêmicos (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 26/02/2018; LEE et al., 2017).

Em *A. baumannii* as variantes GES-11 e GES-14 são amplamente disseminadas na Europa (PAGANO et al., 2016b). Outras variantes detectadas em *A. baumannii* incluem: GES-1 e GES-5 (LEE et al., 2017). A variante GES-14, codificada por um gene plasmidial, é considerada a mais preocupante variante enzimática, pois é capaz de hidrolisar eficientemente todos os β -lactâmicos apresentando potencial quatro vezes maior ao da GES-2 em hidrolisar imipenem, meropenem e ertapenem. A análise do contexto genético desta variante mostrou que além de possuir um forte promotor à montante do gene, que certamente deve estar envolvido com a eficácia relacionada desta variante, o gene está presente em uma estrutura originada a partir da fusão de dois integrons de classe 1 contendo oito genes cassetes de resistência (BONNIN et al., 2010).

2.4.3.6 RESISTÊNCIA ÀS FLUOROQUINOLONAS

As fluoroquinolonas, assim chamadas devido a adição de um íon flúor na posição C6, foram modificadas a partir do ácido nalidíxico que possibilitou um aumento da potência em bactérias Gram-negativas e ampliou seu espectro de ação. A primeira fluoroquinolona produzida foi norfloxacin, em 1986, seguida de ciprofloxacina, em 1987. Desde então, mais de 30 fluoroquinolonas são conhecidas,

embora somente ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina e ofloxacina são permitidos pelo *Federal Drug Administration* para o tratamento de infecções (NAEEM et al., 2016; HOOPER; JACOBY, 2016).

Esta classe de antimicrobianos é considerada bactericida porque age na replicação, transcrição, recombinação, e condensação do DNA ao se ligar de forma reversível às enzimas DNA girase e topoisomerase IV, responsáveis pela clivagem e enovelamento das fitas de DNA. Ambas as enzimas possuem duas subunidades codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* na DNA girase e *parC* e *parE* na topoisomerase IV. Mutações na DNA girase representam a maior causa de resistência às fluoroquinolonas em *A. baumannii*. As mutações mais frequentes são observadas na subunidade *gyrA*, nos códons (Ser83 e Asp87) que codificam aminoácidos essenciais para a interação com as fluoroquinolonas, sendo que a CIM a estes antimicrobianos varia de acordo com a substituição do aminoácido. Outros mecanismos associados à resistência as fluoroquinolonas em Gram-negativos incluem: os genes *aac(6')-Ib-cr* e *qnr*, sistemas de efluxo e diminuição da permeabilidade celular (NAEEM et al., 2016; HOOPER; JACOBY, 2016; YANAT et al., 2016).

Os genes *qnr* (*quinolone resistance*) codificam proteínas pentapeptídicas que se ligam às subunidades A e B da DNA girase e protegem o sítio de ligação das fluoroquinolonas (HOOPER; JACOBY, 2016). Até o momento, os *qnr* foram classificados em sete grupos: *qnrA* (variantes A1 até A8), *qnrB* (variantes B1 até B92), *qnrC*, *qnrD* (variantes D1 até D3), *qnrE1*, *qnrS* (variantes S1 até S9), *qnrVc* (variantes Vc1, Vc3 até Vc7) (Lahey Clinic Database, acesso em: 18/01/2018). Em geral, estudos mostraram que estas variantes apresentam atividade de proteção distintas dependendo da sequência de aminoácidos que possuem e consequentemente da estrutura proteica, resultando em CIM diferentes de acordo com sua ação protetiva. Genes homólogos aos *qnr* transferidos por plasmídeo são encontrados nos cromossomos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Shewanella algae*. Além disso, a análise da sequência de nucleotídeos mostrou identidade de 98.0% entre a *qnrA1* com a *Saqnr* de *S. algae*. Similarmente, a *qnrS1* e *qnrC* apresentam identidade de 97.0% com a *Vpqr* de *Vibrio parahemolyticus* (RODRÍGUEZ-MATÍNEZ et al., 2016).

Outros fatores de resistência plasmidial em Gram-negativos incluem os sistemas de efluxo OqxAB e QepA e a atividade de acetiltransferase *aac(6')-Ib-cr*.

Os sistemas de efluxo OqxAB e QepA não estão associados a CIM altas, mas variam com os substratos utilizados: OqxAB está associado a resistência a ciprofloxacina, norfloxacina, ácido nalidíxico, trimetoprim, e cloranfenicol; enquanto, QepA está associado a resistência às fluoroquinolonas hidrofílicas como ciprofloxacina e norfloxacina. A acetiltransferase AAC(6')-Ib-cr e sete variantes semelhantes conferem resistência associada às fluoroquinolonas que contém nitrogênio no anel piperazinil, presente em ciprofloxacina e norfloxacina, sendo que outras fluoroquinolonas não são acetiladas por estas enzimas (YANAT et al., 2016; RODRÍGUEZ-MATÍNEZ et al., 2016).

2.4.3.7 RESISTÊNCIA AOS AMINOGLICOSÍDEOS

O primeiro antimicrobiano descrito da classe dos aminoglicosídeos foi a estreptomicina, descoberta em 1944 em *Streptomyces griseus*. Desde então mais de 200 antimicrobianos pertencentes a esta classe foram relatados, embora poucos sejam permitidos para uso médico. Os aminoglicosídeos possuem amplo espectro de ação atuando em uma vasta gama de microrganismos Gram-negativos, estafilococos e *Mycobacterium tuberculosis*, e embora apresentem nefrotoxicidade e ototoxicidade são amplamente utilizados em isolados resistentes ao β -lactâmicos e às fluoroquinolonas (TAKAHASHI; IGARASHI, 2017; DOI et al., 2016).

Existem duas classificações baseadas na estrutura química que dividem os aminoglicosídeos em: àqueles que possuem 2-deoxistreptamina (2-DOS) presente em gentamicina, amicacina, tobramicina, canamicina, dibecacina, arbecacina, isepamicina, neomicina, paromomicina, ribostamicina, e apramicina; e àqueles que não possuem 2-deoxistreptamina presente em estreptomicina, dihidrostreptomicina, espectinomicina, kasugamicina e validamicina. Estes antimicrobianos são considerados bactericidas por atuarem na síntese proteica. Eles se ligam ao sítio A do 16S rRNA, que é responsável pelo reconhecimento do tRNA, da subunidade 30S do ribossomo resultando em ausência da tradução ou em tradução errônea do mRNA, levando a produção de proteínas anômalas (TAKAHASHI; IGARASHI, 2017; DOI et al., 2016).

Os mecanismos de resistência detectados em aminoglicosídeos são decorrentes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), 16S rRNA metiltransferases (metilases), mutação de sítio alvo, alteração de permeabilidade, e

hiperexpressão de sistemas de efluxo. O mecanismo de resistência prevalente em *A. baumannii* são mediadas pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que incluem as acetiltransferases (AAC), fosfotransferases (APH) e nucleotidiltransferases (ANT). Estas enzimas possuem substratos específicos e são denominadas de acordo com o os sítios amino ou hidroxil do antimicrobiano ao qual modificam e a parte da molécula ao qual é modificada, ocasionando em compostos com atividade antimicrobiana não funcional (LIU et al. 2015; TAKAHASHI; IGARASHI, 2017). Como exemplo, a acetiltransferase AAC(3)-IIa possui maior afinidade por gentamicina, enquanto a AAC(6')-Ib modifica com maior eficiência a amicacina, tobramicina e canamicina (WANG et al., 2016; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2016). Outras enzimas modificadoras de aminoglicosídeos detectadas em *A. baumannii* incluem: as acetiltransferases AAC(3)-I, AAC(3)-Ia, AAC(3')-Ia, AAC(3)-IIa, AAC(3')-Ih, AAC(6')-Ib; as fosfotransferases APH(3')-I, APH(3')-Ia, APH(3')-IIb, APH(3')-VIa; e as nucleotidiltransferases ANT(2')-Ia, ANT(2'')-Ia, ANT(3')-Ia, ANT(3'')-I, ANT(3'')-Ia (NIE et al., 2014; LIU et al., 2015; WANG et al., 2016; SHEIKHALIZADEH et al., 2016). Em geral, a CIM de isolados produtores destas enzimas varia de 16µg/mL a 256µg/mL para seu(s) respectivo(s) substrato(s).

As metilases são enzimas produzidas naturalmente por microrganismos como *Streptomyces* spp. e *Micromonospora* spp. que incorporam um grupo metil em bases específicas no sítio A do RNA ribossomal 16S impedindo a formação da ponte de hidrogênio a ser formada na ligação dos aminoglicosídeos ao ribossomo (WACHINO; ARAKAWA, 2012). A classificação das metilases é baseada na posição do nucleotídeo a ser metilado, e, em consequência da especificidade da ligação, proporciona altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos. A metilação no nucleotídeo G1405 característico das enzimas adquiridas ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtG, e RmtH confere resistência aos aminoglicosídeos do grupo 4,6-DOS. Entretanto, a metilação no nucleotídeo A1408 característico da enzima adquirida NpmA tem a capacidade de conferir resistência a todos os grupos de aminoglicosídeos (TAKAHASHI; IGARASHI, 2017; DOI et al., 2016). Dentre as metilases, a mais prevalente mundialmente em *A. baumannii* é a ArmA. Em *A. baumannii* foram obtidas taxas de detecção de ArmA de 98.0%, 94.4%, e 87.1% em isolados clínicos que apresentaram alta concentração inibitória mínima ($\geq 256\mu\text{g/mL}$) aos aminoglicosídeos na China, Irã e Vietnã, respectivamente (NIE et al., 2014; LIU et al., 2015; SHEIKHALIZADEH et al., 2016).

A grande preocupação observada nos isolados clínicos é o acúmulo de genes codificadores destas enzimas em plasmídeos conjugativos que permitem a disseminação da resistência a vários aminoglicosídeos, principalmente porque estão associados às plataformas genéticas móveis, como transposons (*armA*) e integrons (AMEs) (WANG et al., 2016; LIU et al. 2015; ESTERLY et al., 2011).

Outro mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos frequente em *A. baumannii* inclui a hiperprodução dos sistemas de efluxo tipo AdeABC e AbeM, ambos exportam com maior afinidade a gentamicina, e menor afinidade amicacina e canamicina (ESTERLY et al., 2011).

2.4.3.8 RESISTÊNCIA AS POLIMIXINAS

Após 1990, a emergência de isolados MR no ambiente hospitalar, principalmente em Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, associada à indisponibilidade de novos antimicrobianos levou à avaliação de antigos fármacos como alternativas de tratamento para as infecções complicadas causadas por estes patógenos. As polimixinas, antes pouco utilizadas devido a sua alta toxicidade, representam, atualmente, os últimos antimicrobianos utilizados em isolados resistentes aos β-lactâmicos, principalmente para aqueles com múltipla resistência: aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos, e fluoroquinolonas (BIALVAEI; KAFIL, 2014).

As polimixinas são lipopeptídeos anfipáticos e catiônicos com efeito bactericida em Gram-negativos, pois interagem com a região hidrofóbica carregada negativamente do lipídeo A do LOS competindo com íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e desestabilizando a membrana externa. Dessa forma, causam aumento da permeabilidade da membrana externa e instabilidade celular, resultando na morte bacteriana. Embora o mecanismo de interação com o lipídeo A seja compreendido, os mecanismos que resultam na lise celular ainda não estão completamente elucidados (BIALVAEI; KAFIL, 2014; CHEN et al., 2015; CHEAH et al., 2016).

Cinco polimixinas são descritas (A-E), entretanto aquelas utilizadas na prática clínica incluem a polimixina B e polimixina E (colistina). A colistina constitui o antimicrobiano mais utilizado para o tratamento de pacientes devido a sua maior disponibilidade, embora seja considerado nefrotóxico (BIALVAEI; KAFIL, 2014; CHEN et al., 2015). A preocupação mundial consiste em monitorar a resistência dos microrganismos a estes antimicrobianos devido ao fato de serem as últimas

alternativas terapêuticas para BGN ER, a resistência a estes fármacos poderia resultar em patógenos PR e, conseqüentemente, em infecções intratáveis (LIU et al., 2016).

Em *A. baumannii* já foram detectados 30 genes envolvidos na resistência à colistina codificada por genes cromossomais. Estes genes sofreram mutações e adaptações celulares para permitir, por meio de mudanças em processos fisiológicos, a aquisição de resistência à colistina (HOOD et al., 2012). Até recentemente acreditava-se que a resistência às polimixinas em *A. baumannii* era mediada por fatores associados às mutações nos genes cromossomais *pmrA* ou *pmrB*; inativação da via biossintética dos genes *lpxA*, *lpxC*, ou *lpxD* que codificam o lipídeo A devido a inserção do IS*Aba11*; perda ou diminuição da porina OmpW; e alteração da conformação do LOS através da disrupção do gene *lpsB*, dentre outros mecanismos intrínsecos (HOOD et al., 2012; BIALVAEI; KAFIL, 2014; LIU et al., 2016; NHU et al., 2016). Entretanto, em 2015 foi descrito o primeiro mecanismo de resistência adquirida às polimixinas mediada por transferência horizontal de genes. O gene *mcr-1* (*plasmid-mediated colistin resistance*), detectado em *E. coli* isoladas de suínos na China, possui 63.0% de similaridade com o gene da fosfoetanolamina transferase produzida intrinsecamente por *Paenibacillus sophorae* indicando possível transferência intergênica entre estas espécies. Este gene conferiu resistência às polimixinas com CIM variando de 2µg/mL a 8µg/mL nos transconjugantes e transformantes, em estudo realizado em murinos (LIU et al., 2016). Estes autores ressaltam que a presença do gene *mcr-1* em *E. coli* isolados de suínos, previamente a isolados de pacientes hospitalizados, pode ser decorrente do uso extensivo de colistina na agricultura, sendo a China a maior consumidora deste antimicrobiano.

Embora recentemente descrito, o gene *mcr-1* possui disseminação mundial em Enterobacteriaceae, principalmente *E. coli* e *K. pneumoniae*, isoladas de animais, alimentos, e humanos, e apresenta inclusive seis variantes, *mcr-1*, *mcr-1.2*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, e *mcr-5* (BOROWIAK et al., 2016). Na América Latina, a primeira detecção ocorreu na Argentina no início de 2016, onde nove isolados clínicos de *E. coli* foram positivos para o gene (RAPOPORT et al., 2016). Em agosto de 2016, foi publicado o primeiro relato do *mcr-1* no Brasil em *E. coli* isolada de fragmento de tecido de um paciente com ferida no pé decorrente de complicações da diabetes (FERNANDES et al., 2016a). No Paraná, Fernandes et al. (2016b) detectaram o gene *mcr-1* em catorze *E. coli* isoladas de fezes de galinhas saudáveis.

2.4.3.9 RESISTÊNCIA A OUTROS ANTIMICROBIANOS

As tetraciclina são antimicrobianos de amplo espectro de ação e com efeito bacteriostático. Estes antimicrobianos atuam na inibição da síntese proteica pois se ligam na subunidade 30S e impedem a ligação do tRNA ao mRNA. As tetraciclina disponíveis para uso clínico incluem: clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demetilclortetraciclina, rolitetraciclina, limeciclina, clomociclina, metaciclina, doxiciclina, minociclina, e tigeciclina. A tigeciclina, uma glicilciclina pertencente a classe das tetraciclina, possui o mesmo sítio de ação das outras tetraciclina mas apresenta uma conformação diferente que permite uma maior afinidade de ligação ao ribossomo (GROSSMAN 2016; CHUKWUDI 2016)

Os mecanismos de resistência descritos em tetraciclina são mutações de sítio alvo, produção de proteínas de proteção ribossomal, e hiperexpressão de sistemas de efluxo (GROSSMAN 2016; CHUKWUDI 2016). Em *A. baumannii*, os mais frequentes mecanismos de resistência são: produção de proteínas de proteção ribossomal TetM que catalizam a liberação da tetraciclina ao ribossomo mas não atuam em tigeciclina; e a hiperprodução dos sistemas de efluxo AdeABC, AdeFGH, e AdeIJK que conferem resistência às tetraciclina, incluindo tigeciclina (YILMAZ; OZCENGIZ, 2016; LEE et al., 2017).

A combinação sinérgica sulfametoxazol-trimetoprim possui amplo espectro de ação e efeito bactericida, embora os antimicrobianos isolados sejam considerados bacteriostáticos. Ambos antimicrobianos agem na síntese do ácido fólico em duas etapas: o sulfametoxazol inibe a enzima diidropteroato sintase e o trimetoprim inibe a enzima diidrofolato redutase (FALAGAS et al. 2015; KAYE et al. 2017; YILMAZ; OZCENGIZ, 2016).

A resistência a estes antimicrobianos em *A. baumannii* são decorrentes de dois mecanismos: hiperexpressão de sistemas de efluxo AdeFGH para exportação de sulfonamidas e trimetoprim, e de AdeABC e AdeIJK para o efluxo de trimetoprim; e alteração das enzimas da via de síntese pela aquisição dos genes *sul1* e *sul2* (em sulfonamidas) e *dfr* e *dhfr* (em trimetoprim). O último mecanismo é preocupante pois confere altos níveis de resistência à sulfametoxazol-trimetoprim além do fato dos genes encontrarem-se localizados em integrons, o que facilita a sua disseminação, principalmente no ambiente hospitalar (FALAGAS et al. 2015; KAYE et al. 2017; YILMAZ; OZCENGIZ, 2016).

REFERÊNCIAS

AL ATROUNI, A. et al. Reservoirs of non-baumannii *Acinetobacter* Species. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 1-12, 2016. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00049>.

ALAEI, N.; AZIEMZADEH, M.; BAHADOR, A. Antimicrobial resistance profiles and genetic elements involved in carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates from a referral hospital in Southern Iran. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 5, p. 75-79, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2015.12.005>.

ALMASAUDI, S. B. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p.1-27, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009>.

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 289, p. 321-331, 1980.

ANTONIO, C.S. et al. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*_{OXA-143} gene in Brazilian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1322-1323, 2011.

ANTUNES, N.; FISHER, J. Acquired Class D β -Lactamases. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p.398-434, 2014. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics3030398>.

ANVISA. Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência antimicrobiana no ano de 2015. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº14. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2016.

BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R. Y. A study of *Moraxella* group II. oxidase-negative species (Genus *Acinetobacter*). **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 5, p. 1520-1541, 1968.

BERTINI, A. et al. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4168-4177, 2010.

BIALVAEI, A. Z.; KAFIL, H. S. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. **Current Medical Research and Opinion**, v. 31, n. 4, p. 707-721, 2015. <http://dx.doi.org/10.1185/03007995.2015.1018989>.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2014. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3380>.

BONNIN, R. A. et al. Carbapenem-Hydrolyzing GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p.349-354, 2010. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00773-10>.

BONOMO, R.A. β -lactamases: a focus on current challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a025239>.

BOROWIAK, M. et al. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in *d*-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.72, p. 3317-3324, 2017.

BROSSARD, K.A.; CAMPAGNARI, A.A. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. **Infection and Immunity**, 2011. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.05913-11>.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

CAG, Y.; CASKURLU, H.; FAN, Y.; CAO, B.; VAHABOGLU, H. Resistance mechanisms. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 17, 2016. <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2016.09.14>.

CAMPOS, A. C. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–producing *K. pneumoniae*: A systematic review. **American Journal of Infection Control**, p. 1-7, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.022>.

CARRARA-MARRONI, F. E. et al. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 4, p. 304-306, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2015.07.002>.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 8, n. 4, p. 4654-4661, 2004.

CASTILHO, S.R.A. et al. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: molecular and drug susceptibility profiles. **PLoS ONE**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176790>.

CAVALCANTI, F. L. S. et al. Emergence of extensively drug-resistant OXA-72–producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 3, p. 250-251, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.022>.

CAVALCANTI, F.L.S. et al. High frequency of OXA-253-producing *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. 1-3, 2016.

CAVALINI, J.F. et al. Alta frequência de isolados de *Acinetobacter* spp. multirresistentes provenientes do laboratório de microbiologia clínica do hospital universitário de Londrina entre 2014 a 2015. **6º Congresso Paranaense de Ciências Biomédicas**, 2016.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/> acesso dia: 23/09/2016.

CHEAH, S. et al. Polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*: genetic mutations and transcriptomic changes in response to clinically relevant dosage regimens. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-11, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep26233>.

CHEN, Z. et al. Meta-analysis of colistin for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-8, 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/srep17091>.

CHEN, Y.; GAO, J.; ZHANG, H.; YING, C. Spread of the *bla*_{OXA-23}-containing Tn2008 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates grouped in CC92 from China. **Frontiers in Microbiology**, 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00163>.

CHIANG, S.R. et al. Desiccation and ethanol resistances of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* embedded in biofilm: the favorable antiseptic efficacy of combination chlorhexidine gluconate and ethanol. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2017.02.003>.

CHOI, C.H. et al. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1127-1138, 2005.

CHUKWUDI, C.U. rRNA binding sites and the molecular mechanism of action of the tetracyclines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4433-4442, 2016.

CLEMMER, K.M.; BONOMO, R.A.; RATHER, P.N. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. **Microbiology**, v. 157, p. 2534-2544, 2011.

CLÍMACO, E. C. et al. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 127-133, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.024>.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-sixth informational supplement. Document M100S. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Wayne, PA: CLSI; 2016.

CROFTS, T.S.; GASPARRINI, A.J.; DANTAS, G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 422-434, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.28>

D'SOUZA, R. et al. First report of the carbapenemase gene *bla_{OXA-499}* in *Acinetobacter pittii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, 2017.

DE SILVA, P.M.; KUMAR, A. Effect of sodium chloride on surface-associated motility of *Acinetobacter baumannii* and the role of AdeRS two-component system. **The Journal of Membrane Biology**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-017-9985-7>.

DENG, Y. et al. Resistance integrons: class 1, 2 and 3. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>.

DOI, A.; MURRAY, Y.; PELEG, G. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of Antimicrobial Resistance—Treatment Options. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 01, p.085-098, 2015. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1398388>.

DOI, Y.; WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Aminoglycoside resistance the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. **Infectious Disease Clinics of North America**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011>.

EIJKELKAMP, B.A.; STROEHER, U.H.; HASSAN, K.A.; PAULSEN, I.T.; BROWN, M.H. Comparative analysis of surface-exposed virulence factors of *Acinetobacter baumannii*. **BMC Genomics**, 2014. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/1020>.

ESTERLY, J.S.; RICHARDSON, C.L.; ELTOUKHY, N.S.; QI, C.; SCHEETZ, M.H. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii*. **The Annals of Pharmacotherapy**, 2011. <http://dx.doi.org/10.1345/aph.1P084>.

FALAGAS, M.E; VARDAKAS, K.Z.; ROUSSOS, N.S. Trimethoprim/sulfamethoxazole for *Acinetobacter* spp.: a review of current microbiological and clinical evidence. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, p. 231-241, 2015.

FERNANDES, M. R. et al (a). First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6415-6417, 2016. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01325-16>.

FERNANDES, M. R. et al (b). Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Euro Surveill.**, v. 21, n. 17, p. 1-6, 2016. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2016.21.17.30214>.

FIESTER, S.E. et al. Iron-regulated phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. **PLoS ONE**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0167068>.

FIGUEIREDO, D.Q.; et al. First report of the *bla*_{OXA-58} gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 368-370, 2011.

FOURNIER, P. et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 1, p. 62-72, 2006. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0020007>.

<FTP://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 26/02/2018.

GAGNAIRE, J. et al. Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*: an outbreak report with special highlights on economic burden. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 47, p. 279-285, 2017.

GEISINGER, E.; ISBERG, R.R. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS Pathogens**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004691>.

GIONCO, B. et al. Detection of OXA-231, a new variant of *bla*_{OXA-143}, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2531-2532, 2012. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks223>.

GIRLICH, D. et al. OXA-253, a variant of the carbapenem-hydrolyzing class d β -lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p.2976-2978, 2014. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02640-13>.

GOH, H.M.S. et al. Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 21, p. 6535-6543, 2013.

GONZALEZ-VILLORIA, A. M.; VALVERDE-GARDUNO, V. Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* increasing success remains a challenge as a nosocomial pathogen. **Journal of Pathogens**, v. 2016, p. 1-10, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7318075>.

GROSSMAN, T.H. Tetracycline antibiotics and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>.

GU, Z. et al. Risk factors and clinical outcomes for patients with *Acinetobacter baumannii* bacteremia. **Medicine**, v. 95, n. 9, p. 1-6, 2016. <http://dx.doi.org/10.1097/md.0000000000002943>.

GUSATTI, C.S. et al. First occurrence of *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii* isolated from a clinical sample in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 243-246, 2012. ISSN: 1517-8382.

HALL, J.P.J.; BROCKHURST, M.A.; HARRISON, E. Sampling the mobile gene pool: innovation via horizontal gene transfer in bacteria. **Phil. Trans. R. Soc.**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0424>.

HARDING, C.M.; HENNON, S.W.; FELDMAN, M.F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>.

HIGGINS, P. G. et al. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5035-5038, 2009. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00856-09>.

<HTTP://www.bacterio.net/acinetobacter.html>. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Último acesso: 16/01/2018.

HOOD, M. I. et al. Genetic determinants of intrinsic colistin tolerance in *Acinetobacter baumannii*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 2, p. 542-551, 2012. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00704-12>.

HOOPER, D.C.; JACOBY, G.A. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a025320>.

HOW, K.Y. et al. Unravelling the genome of long chain *N*-acylhomoserine lactone-producing *Acinetobacter* sp. Strain GG2 and identification of its quorum sensing synthase gene. **Frontiers in Microbiology**, 2015. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00240>.

HUA, X.; SHU, J.; RUAN, Z.; YU, Y.; FENG, Y. Multiplication of *bla*_{OXA-23} is common in clinical *Acinetobacter baumannii*, but does not enhance carbapenem resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, p. 3381-3385, 2016.

IYER, R.; MOUSSA, S.H.; DURAND-REVILLE, T.F.; TOMMASI, R.; MILLER, A.A. *Acinetobacter baumannii* OmpA is a selective antibiotic permeant porin. **ACS Infectious Diseases**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00168>.

JAWAD, A.; SEIFERT, H.; SNELLING, A. M.; HERITAGE, J., HAWKEY, P.M. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1938-1941, 1998.

JHA, C.; GHOSH, S.; GAUTAM, V.; MALHOTRA, P.; RAY, P. Invitro study potential of *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles. **Microbial Pathogenesis**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.048>.

JOHNSON, T.L.; WAACK, U.; SMITH, S.; MOBLEY, H.; SANDKVIST, M. *Acinetobacter baumannii* is dependent on the type II secretion system and its substrate LipA for lipid utilization and in vivo fitness. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 4, p. 711-719, 2016.

KAASE, M. et al. Description of the metallo- β -lactamase GIM-1 in *Acinetobacter pittii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p. 81-84, 2013. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt325>.

KAYE, K.S.; GALES, A.C.; DUBOURG, G. Old antibiotics for multidrug-resistant pathogens: from in vitro activity to clinical outcomes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, p. 542-548, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.020>.

KARAH, N. et al. Novel aminoglycoside resistance transposons and transposon-derived circular forms detected in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1801-1818, 2016. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02143-15>.

KROGER, C.; KARY, S.C.; SCHAUER, K.; CAMERON, A.D.S. Genetic regulation of virulence and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Genes**, 2016. <http://dx.doi.org/10.3390/genes8010012>.

LAHEY CLINIC DATABASE. **Lahey Clinic**. Disponível em: <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1> acesso dia: 08/01/2018.

LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1584-1590, 1999.

LABBATE, M.; CASE, R.J.; STOKES, H.W. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. **Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux**, v. 532, 2009. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9_6.

LEE, C.R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>.

LIU, Z.; LING, B.; ZHOU, L. Prevalence of 16S rRNA methylase, modifying enzyme, and extended-spectrum beta-lactamase genes among *Acinetobacter baumannii* isolates. **Journal of Chemotherapy**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1179/1973947814Y.0000000190>.

LIU, Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(15)00424-7).

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.

MARINHO, C.M.; SANTOS, T.; GONÇALVES, A.; POETA, P.; IGREJAS, G. A decade-long commitment to antimicrobial resistance surveillance in Portugal. **Frontiers in Microbiology**, 2016. <http://dx.doi.org/fmicb.2016.01650>.

MARTINS, N. et al. A new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clones. **Infection, Genetics, and Evolution**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.031>.

MATHLOUTHI, N. et al. Early detection of metallo- β -lactamase NDM-1- and OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Libyan hospitals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 1, p. 46-50, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.03.007>.

MELETIS, G. et al. Containment of carbapenem resistance rates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in a Greek hospital with a concomitant increase in colistin, gentamicin and tigecycline resistance. **New Microbiologica**, v. 38, p. 417-421, 2015.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 1, p. 15-21, 2016. <http://dx.doi.org/10.1177/2049936115621709>.

MIRANDA, C.C. et al. Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 6, p. 1276-1286, 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12792>.

MOSTACHIO, A.K. et al. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 396-401, 2012.

NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257-1263, 2008. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01451-07>.

NAEEM, A.; BADSHAH, S.L.; MUSKA, M.; AHMAD, N.; KHAN, K. The current case of quinolones: synthetic approaches and antibacterial activity. **Molecules**, 2016. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21040268>.

NHU, et al. Early detection of metallo- β -lactamase NDM-1- and OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Libyan hospitals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 1, p. 46-50, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.03.007>.

NIE, L. et al. Genetic basis of high level aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* from Beijing, China. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 4, p. 295-300, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2014.06.004>.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infectious globally: final report and recommendations. **The Review on Antibiotic Resistance**, 2016. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

OH, M.H.; CHOI, C.H.; LEE, J.C. The effect of IS*Aba*1-mediated *adeN* gene disruption on *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. **Virulence**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2017.1339859>.

OPAZO, A. et al. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **J Infect Dev Ctries**, v. 6, n. 4, p. 311-316, 2012.

OU, H.Y. et al. Complete genome sequence of hypervirulent and outbreak-associated *Acinetobacter baumannii* strain LAC-4: epidemiology, resistance genetic determinants and potential virulence factors. **Scientific Reports**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/srep08643>.

PAGANO, M. et al. (a). Emergence of *Acinetobacter baumannii* ST730 carrying the *bla*_{OXA-72} gene in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 9, p. 597-598, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160188>.

PAGANO, M.; MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. (b). Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-8, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.005>.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2006. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00058-07>.

PICÃO, R. C. et al. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and *Enterobacteriaceae* in sewage. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 1, p. 80-85, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.001>.

POIREL, L.; COLLET, L.; NORDMANN, P. Carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. **Emerg Infect Dis**, v. 6, p. 84-85, 2000.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 24-38, 2010. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01512-08>.

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 6, p. 568-585, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>.

RAPOPORT, M. et al. First Description of *mcr*-1-mediated colistin resistance in human infections caused by *Escherichia coli* in Latin America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4412-4413, 2016. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00573-16>.

RIDENHOUR, B.J. et al. Persistence of antibiotic resistance plasmids in bacterial biofilms. **Evolutionary Applications**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/eva.12480>.

RIBEIRO, P.C.S. et al. Phenotypic and molecular detection of the *bla_{KPC}* gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-2072-3>.

ROBLEDO, I. E. et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1354-1357, 2010. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00899-09>.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.M. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: two decades on. **Drug Discovery Updates**, v. 26, p. 13-29, 2016.

ROSSI, E. et al. Glucose availability enhances lipopolysaccharide production and immunogenicity in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Future Microbiology**, 2016. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.15.153>.

SABATH, L.D.; ABRAHAM, E.P. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. **Biochem. J.**, v. 98, p. 11-13, 1966.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Biomed Research International**, v. 2016, p. 1-8, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2475067>.

SARANATHAN, R. et al. Disruption of tetR type regulator *adeN* by mobile genetic element confers elevated virulence in *Acinetobacter baumannii*. **Virulence**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2017.1322240>.

SELASI, G.N. et al. Differences in biofilm mass, expression, of biofilm-associated genes, and resistance to desiccation between epidemic and sporadic clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* sequence type 191. **PLoS ONE**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0162576>.

SIGUIER, P.; GOURBEYRE, E.; VARANI, A.; TON-HOANG, B.; CHANDLER, M. Everyman's guide to bacterial insertion sequences. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, 2015. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0030-2014>.

SHEIKHALIZADEH, V. et al. Comprehensive study to investigate the role of various aminoglycoside resistance mechanisms in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2016.09.012>.

SPELLBERG, B.; REX, J.H. The value of single-pathogen antibacterial agents. **Nature Review Drug Discovery**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3957-c1>.

STAHL, J.; BERGMANN, H.; GOTTIG, S.; EBERSBERGER, I.; AVERHOFF, B. *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. **PLoS ONE**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0138360>.

TAKAHASHI, Y.; IGARASHI, M. Destination of aminoglycoside antibiotics in the 'post-antibiotic era'. **The Journal of Antibiotics**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2017.117>.

TAYABALI, A.F. et al. Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

TURTON, J. F. et al. The role of IS*Aba*1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **Fems Microbiology Letters**, v. 258, n. 1, p. 72-77, 2006. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x>.

VASCONCELLOS, F.M. et al. Evaluation of a new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clonal complexes circulating in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.009>.

VASCONCELOS, A. T. R. et al. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 83, n. 4, p. 382-385, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.08.006>.

VIANA, G. F. et al. IS*Aba1*/*bla*_{OXA-23}: A serious obstacle to controlling the spread and treatment of *Acinetobacter baumannii* strains. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 5, p. 593-595, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2015.11.020>.

VILA-FARRÉS, X. et al. Loss of LPS is involved in the virulence and resistance to colistin of colistin-resistant *Acinetobacter nosocomialis* mutants selected *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkv244>.

VILA-FARRÉS, X. et al. Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. **Scientific Reports**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-14972-y>.

VISCA, P.; SEIFERT, H.; TOWNER, K.J. *Acinetobacter* infection – an emerging threat to human health. **Life**, v. 63, n. 12, p. 1048-1054, 2011.

WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. **Drug Resistance Updates**, v. 15, p. 133-148, 2012.

WANG, Y. et al. Prevalence of carbapenemases among high-level aminoglycoside-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in China. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, p. 3642-3652, 2016. <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2016.3828>.

WATANABE, M. et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, p. 147-151, 1991.

WEBER, B.S.; KINSELLA, R.L.; HARDING, C.M.; FELDMAN, M.F. The secrets of *Acinetobacter* secretion. **Trends in Microbiology**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.005>.

WISPLINGHOFF, H. et al. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal Of Hospital Infection**, v. 66, n. 2, p. 174-181, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2007.02.016>.

WHO. Global Action Plan on Antimicrobial resistance. **World Health Organization**, 2015. ISBN 9789241509763

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organization**, 2017. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1

WU. J.; LIU, L.L.; WANG, G.; LU, J. One health in China. **Infection Ecology & Epidemiology**, 2016. <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v6.33843>.

XIAO, S. et al. Resistant mechanisms and molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Molecular Medicine Reports**, p. 2483-2488, 2016. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2016.5538>.

YANAT, B.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, J.M.; TOUATI, A. Plasmid-mediated quinolone resistance in Enterobacteriaceae: a systematic review with a focus on Mediterranean countries. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-016-2847-x>.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.45.4.1151-1161.2001>.

YILMAZ, Ç.; OZCENGİZ, G. Antibiotics: pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. **Biochemical Pharmacology**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.005>.

YONG D. et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, p. 5046–5054, 2009.

ZARRILLI, R. et al. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 1, p. 11-19, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008>.

ZHAO, W.; HU, Z. Acquired metallo- β -lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. **Future Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 873-887, 2015. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.15.18>.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar determinantes de resistência adquirida aos antimicrobianos e a capacidade de formação de biofilme de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes recuperados da corrente sanguínea de pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina no período de novembro de 2006 a dezembro de 2016.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar dados clínicos dos pacientes com *A. baumannii* selecionados para este estudo;
- Estabelecer a classificação de resistência dos isolados;
- Determinar a concentração inibitória mínima aos antimicrobianos: ceftazidima, imipenem, meropenem, polimixina B, colistina e tigeciclina;
- Avaliar fenotipicamente a produção de carbapenemases;
- Detectar a presença dos determinantes de resistência *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, *bla*_{GES}, *mcr-1*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, and *qnrVc*, e de virulência *bap*;
- Estabelecer a frequência dos principais determinantes de resistência antimicrobiana adquirida detectados;
- Analisar o contexto genético dos isolados carreadores do gene *bla*_{OXA-23-like};
- Determinar a similaridade genética entre os isolados;
- Investigar a presença de clones epidêmicos mundiais;
- Verificar a capacidade de produção de biofilme dos isolados.

4 ARTIGO A – European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

TENDÊNCIAS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E VIRULÊNCIA EM *Acinetobacter baumannii* ISOLADOS DE CORRENTE SANGUÍNEA: UM ESTUDO DE 10 ANOS EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO BRASILEIRO

ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND VIRULENCE TRENDS IN *Acinetobacter baumannii* ISOLATED FROM BLOODSTREAM: A 10 YEAR STUDY IN A BRAZILIAN TERTIARY HOSPITAL

Priscila Romanin^{1,2,3}, Floristher Elaine Carrara-Marroni², Lucy Megumi Yamauchi³.

1. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil
2. Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência Antimicrobiana - LEMRA, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil
3. Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil

RESUMO

Este artigo tem como objetivo caracterizar os principais mecanismos de resistência adquirida aos antimicrobianos em isolados multirresistentes de *A. baumannii* isolados de corrente sanguínea de pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina no período de novembro de 2006 a dezembro de 2016. Neste estudo foram realizados: a análise dos dados dos pacientes infectados, identificação bacteriana, perfil de sensibilidade e classificação da resistência dos isolados clínicos, detecção fenotípica de carbapenemases, investigação de genes de resistência antimicrobiana, análise do contexto genético do gene *bla*_{OXA-23-like}, tipagem molecular, e detecção de complexos clonais epidêmicos. Um total de 103 isolados foram analisados, sendo todos identificados como *A. baumannii* por meio da amplificação dos genes *bla*_{OXA-51-like} e *rpoB*. A análise dos aspectos clínicos revelou que os isolados foram recuperados predominantemente de pacientes do sexo masculino, com idade média de 60 anos, internados nas unidades de terapia intensiva, com permanência média de hospitalização de 28 dias. O desfecho clínico que resultou em mortalidade foi observado na maioria dos pacientes (81.6%). Altas taxas de resistência (100.0%-10.7%) foram obtidas para os antimicrobianos avaliados incluindo colistina, polimixina B e tigeciclina e, na sua maioria, os isolados foram classificados como extensivamente resistentes (78.6%). A produção de carbapenemases foi observada em 92.2% dos isolados. Todos os isolados resistentes aos carbapenêmicos apresentaram um dos genes codificadores das *carbapenem hydrolyzing class-D β-lactamase* (CHDL) adquiridas *bla*_{OXA-23-like} (97.9%) ou *bla*_{OXA-143-like} (2.1%). Nenhum dos isolados apresentou os genes *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, *bla*_{GES}, *mcr-1*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, and *qnrVc*. Como contexto genético do gene *bla*_{OXA-23-like} predominou o Tn2006 e em menor frequência o Tn2008. Os isolados carreadores do gene *bla*_{OXA-143-like} apresentaram a variante *bla*_{OXA-253-like}. O gene *bap* foi detectado em 83.5% dos isolados, e todos os isolados recuperados após o ano de 2011 apresentaram este gene. A maioria dos isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme (98.0%), e 86.4% dos isolados foram fortes formadores de biofilme. Um perfil policlonal foi observado dentre os isolados de *A. baumannii*, sendo detectada a presença dos complexos clonais epidêmicos internacionais CC113/79, CC109/1, CC110/25, e CC103/15, com prevalência do CC113/79. Os dados obtidos mostram que a produção de CHDL e, principalmente, a permanência do gene *bla*_{OXA-23} constituiu um importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* no HU. As altas taxas de resistência obtidas e o número elevado de isolados extensivamente resistentes demonstram a dificuldade no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* no HU e alertam para a emergência de infecções intratáveis. O perfil policlonal, a prevalência de clones epidêmicos mundiais, e a capacidade de formação de biofilme reforçam a importância de medidas de controle de infecção e da necessidade premente do desenvolvimento de programas de *stewardship* para evitar a disseminação de novos determinantes de resistência e potenciais surtos por este patógeno.

Palavras-chave: Multirresistente. Extensivamente resistente. CHDL. Diversidade Genética. Complexos clonais epidêmicos.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the main mechanisms of acquired antimicrobial resistance in clinical multidrug-resistant *A. baumannii* isolated from bloodstream of inpatients at Hospital Universitário of Londrina from november of 2006 to december of 2016. It was performed in this study: analysis of the data of the infected patients, bacterial identification, antimicrobial susceptibility profile and resistance classification of clinical isolates, phenotypic detection of carbapenemases, investigation of acquired antimicrobial resistance genes, analysis of the genetic context of the *bla*_{OXA-23-like} gene, molecular typing, and detection of clonal epidemic complexes. A total of 103 isolates were analyzed, all of which were identified as *A. baumannii* by amplification of the *bla*_{OXA-51-like} and *rpoB* genes. The analysis of clinical aspects revealed that *A. baumannii* isolates were predominantly recovered from male patients with mean age of 60 years hospitalized in intensive care units with an average of 28 days of hospital stay. Intrahospital mortality was observed in the majority (81.6%) of the patients. High resistance rates (100.0% -10.7%) were obtained for the evaluated antimicrobials including colistin, polymyxin B and tigecycline, and most isolates were classified as extensively resistant (78.6%). The production of carbapenemases was observed in 92.2% of the isolates. All carbapenem-resistant isolates showed a carbapenem-hydrolyzing class-D β -lactamase being either *bla*_{OXA-23-like} or *bla*_{OXA-143-like}. None of the isolates had the genes *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, *bla*_{GES}, *mcr-1*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, and *qnrVc*. As a genetic context of the *bla*_{OXA-23-like} gene, Tn2006 was predominated, and Tn2008 was less frequent. Isolates harboring the *bla*_{OXA-143-like} gene showed the *bla*_{OXA-253-like} variant. The *bap* gene was detected in 83.5% of the isolates, and all the isolates recovered after the year 2011 presented this gene. Most of the isolates presented biofilm formation capacity (98.0%), and 86.4% of the isolates were strong biofilm producers. A polyclonal profile was observed among the *A. baumannii* isolates. The presence of the international clonal complexes CC113/79, CC109/1, CC110/25, and CC103/15 were detected, with prevalence of CC113/79. The results demonstrate that the production of CHDL and, mainly, the permanence of the *bla*_{OXA-23-like} gene constitutes an important mechanism of resistance to carbapenems in *A. baumannii* in HU. The high resistance rates obtained and the large number of extensively resistant isolates demonstrate the difficulty in treating infections caused by *A. baumannii* in HU and alert to the emergence of untreatable infections. The polyclonal profile, the prevalence of global epidemic clones, and biofilm formation ability reinforce the importance of infection control measures and the urgent need to develop stewardship programs to avoid the spread of new resistance determinants and potential outbreaks by this pathogen.

Key words: Multidrug-resistant. Extensively drug-resistant. CHDL. Genetic diversity. Epidemic clonal complex.

INTRODUCTION

One of the most problematic microorganism globally disseminated in hospital settings is multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* (RAIBLE et al., 2017). Bloodstream infections caused by *A. baumannii* are responsible for increasing morbidity and mortality rates and demanding considerable higher hospital costs (GU et al., 2016). The risk factors associated with MDR *A. baumannii* infections include antibiotic exposure, invasive devices, intensive care unit (ICU) stay, and severity of illness (RAMANATHAN et al., 2017; GU et al., 2016). In 2017, the World Health Organization released a priority list of pathogens threatening human health and classified *A. baumannii* as number one critical pathogen for research and development of new antimicrobials (WHO, 2017).

Carbapenems are the front-line choices for the treatment of MDR *A. baumannii* infections (RAIBLE et al., 2017). The emergence of carbapenem-resistant isolates is a challenge for treatment because the last antimicrobial resources includes polymyxins and tigecycline (KAYE, et al. 2017; SADER, et al., 2016). The carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases (CHDL) *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like}, and *bla*_{OXA-235-like} are the main cause of carbapenem resistance around the world in *A. baumannii* (PAGANO et al., 2016). In Brazil, *bla*_{OXA-23-like} is the prevalent CHDL disseminated in the hospitals (NEVES et al., 2016). This gene was described as inserted in transposons, including Tn2006, Tn2007, Tn2008, and Tn2009 (CHEN et al., 2017). Generally, upstream *bla*_{OXA-23-like} there is IS*Aba*1 (Insertion Sequence *A. baumannii* 1) acting as strong promoter and causing significant increase of expression of *bla*_{OXA-23-like} (HUA et al., 2016).

Nosocomial outbreaks are usually environment-related by contamination of the hospital equipments and by hand of professionals (Chiang et al., 2017). One of the most important virulence characteristics contributing for the persistence of this pathogen in hospital settings and impacting the antimicrobial treatment is biofilm formation (Harding et al. 2017). In *A. baumannii*, the adhesion in abiotic surfaces and eukaryotic cells is related to *bap* (biofilm-associated protein) (Brossard and Campagnari, 2011). Due to the high frequency of *bap* in clinical isolates, this protein has being associated as a genetic nosocomial marker (Sung et al., 2016).

The *A. baumannii* ability to acquire genetic resistance determinants is one of the characteristics strongly associated with the successful adaptation of

international epidemic lineages (VISCA et al. 2011). Multilocus sequence typing schemes of University of Oxford (UO) and Institut Pasteur (IP) for *A. baumannii* having been applied to evaluate the global lineage trends. To date, some of the internationally clonal complexes (UO/IP) related to spread in Brazilian hospitals are CC113/79, CC109/1, CC110/25, CC103/15, and CC118/2 (MARTINS et al., 2016). Molecular epidemiology investigation is essential to understand the outstanding dissemination of this pathogen in hospitals across the world.

Hence, the aim of this study was to analyze the antimicrobial susceptibility profile, antimicrobial resistance genes, biofilm formation, genetic context, clonal relatedness, and internationally clonal complexes of MDR *A. baumannii* isolated from bloodstream at a tertiary hospital in Southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Study design and patients

The study was conducted at tertiary Hospital Universitário of Londrina (HU), Brazil, which is the major public hospital of the Paraná state north region. This hospital has 313 beds and it attends more than 200 surrounding towns. The clinical isolates were recovered from bloodstream of inpatients attended in HU among November of 2006 to December of 2016. The clinical data analyzed included patient gender, age, admitted unit, duration of hospitalization and outcome.

This study was approved by the Ethics Committee certificate no. 14490/2009.

Bacterial identification

The clinical isolates were identified by conventional biochemical tests and by automatized systems MicroScan/Siemens® (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, IN, USA), BD Phoenix™ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), Vitek2® (bioMérieux, Craponne, France) in the Microbiology Laboratory of HU. The isolates recovered from nutrient agar were confirmed as *A. calcoaceticus-baumannii* by coccobacilli morphology using Gram staining, growth assay at 44°C, and oxidase negative test. Molecular identification of the isolates were performed by investigation of *bla*_{OXA-51-like} (TURTON et al., 2006) and specific region of *rpoB* (LI et al., 2016) for *A. baumannii*.

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility assays were performed by disk-diffusion method and by automatized systems according instructions of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) to the following antimicrobials: amikacin (30µg), gentamicin (10µg), ciprofloxacin (5µg), levofloxacin (5µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (25µg), tetracycline (30µg), piperacillin-tazobactam (100/10µg), ampicillin-sulbactam (10/10µg), cefotaxime (30µg), ceftazidime (30µg), cefepime (30µg), imipenem (10µg), and meropenem (10µg).

Minimum inhibitory concentration (MIC) determination by broth microdilution method was performed according to guidelines recommended by the CLSI (2012) to detect susceptibility to ceftazidime, imipenem, meropenem, colistin, polymyxin B, and tigecycline. The results were interpreted using CLSI breakpoints (2017) for all the tested antimicrobials, except for tigecycline in which the criteria for interpretation was adapted from the Food and Drug Administration (FDA) breakpoints for Enterobacteriaceae (susceptible $\leq 2\mu\text{g/mL}$; intermediate $4\mu\text{g/mL}$; resistant $\geq 8\mu\text{g/mL}$).

Quality control for all the methods used for antimicrobial susceptibility testing included *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Resistance classification of multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR), and pandrug-resistant (PDR) used *Acinetobacter* spp. guidelines established by Magiorakos et al. (2011).

Phenotypic detection of carbapenemases

Carbapenemase production was assessed with the CarbAcineto NP test (DORTET et al., 2014). The test interpretation was performed by visual inspection and the changed color (red to orange or red to yellow) of the test suspension was considered positive.

Molecular investigation of antimicrobial resistance and virulence determinants

Genomic DNA was extracted using boiling method (VANEECHOUTTE et al., 1995). Polymerase chain reactions (PCR) assays was applied for the detection of the β -lactamases encoding genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like},

*bla*_{OXA-143-like} (WOODFORD et al., 2006; HIGGINS et al., 2010), *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, (DOYLE et al., 2012) *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, (MENDES et al., 2006) *bla*_{GES} (WANG et al., 2006); colistin acquired resistance *mcr-1* (LIU et al., 2015), and quinolone determinants of resistance *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, and *qnrVc* (KRAYCHETE et al., 2016). The virulence determinant *bap* was detected using protocol previously described (KODORI et al., 2017). For all PCR reactions, it was used the Top Taq Master Mix (Qiagen, Germantown, MD, USA) following the manufacturer's instructions.

The sequencing of *bla*_{OXA-143-like} amplicons was performed with primers designed in this study. The nucleotide sequences in the NCBI GenBank database (accession numbers: NG_049441.1, NG_049483.1, NG_049527.1, NG_049548.1, NG_049550.1, NG_049775.1) were selected and the multiple alignment with ClustalW1.83 (Science Foundation Ireland, Wilton Place, Ireland) was performed to design primers amplifying a conserved region to all the known variants. PCR amplification of the 762bp amplicon was performed using HotStar High Fidelity Taq Polymease (Qiagen, Germantown, MD, USA) according with the manufacturer's instructions using the primers OXA-143-F 5'—CAGCATTCTACTCTACTTTC—3 and OXA-143-R 5'—TCATTACGAATAGAACCAG—3' in the following conditions: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 50°C for 30 sec, 72°C for 1 min and final extension at 72°C for 5 min.

Genetic context of *bla*_{OXA-23-like}

The isolates harboring *bla*_{OXA-23-like} were assessed for the occurrence of Tn2006, Tn2007, Tn2008 and Tn2009 using PCR amplifications strategies as described previously (CHEN et al., 2017). PCR assays were performed using Top Taq Master Mix (Qiagen, Germantown, MD, USA). Different amplicons sizes were further sequenced to confirm the genetic environment.

Enterobacterial repetitive intergenic consensus typing (ERIC-PCR)

Molecular typing of the isolates was performed by ERIC-PCR according protocol described by Silbert et al. (2004) with some modifications. Briefly, the DNA was extracted by boiling method (VANECHOUTTE et al., 1995) and quantified using NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA). The amplification reaction mixtures were performed using Top Taq Master Mix (Qiagen, Germantown, MD, USA). The PCR conditions were initial denaturation of 95°C for 2 minutes, followed by 35 cycles of 90°C for 30 seconds, 40°C for 1 minute, 65°C for 8 minutes, and final extension of 65°C for 5 minutes. The amplicons were separated by 2% agarose gel, stained with 0.5 µg/mL ethidium bromide and visualized by exposure to ultraviolet light (260nm) in the LPIX transilluminator (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brazil). The fragments pattern of each sample was analyzed with BioNumerics software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Gante, Belgium) using Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages (UPGMA) for clustering, and Dice coefficient with 2.0% tolerance for the isolates' similarity. The cut-off value of 90% was applied for clustering the isolates.

Trilocus sequence-based (3LST) multiplex-PCR typing

The presence of the international MLST clonal complex CC113/79, CC109/1, CC110/25, CC103/15, and CC118/2 usually detected in Brazil were investigated by protocol previously developed (MARTINS et al., 2016). The multiplex reactions were carried out using Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA) protocol.

DNA sequencing

Gene fragments of *bla*_{OXA-143-like} and *bla*_{OXA-23-like} genetic context were PCR-amplified, purified utilizing PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and quantified in a 1.2% agarose gel with Low Mass DNA ladder (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Sequencing reactions were prepared with Kit BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and carried out in the ABI 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) machine. Chromatogram results were confirmed with Bioedit v7.0.5 (Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA) and DNA sequences analyzed using the BLAST algorithm in the NCBI GenBank database.

Biofilm formation

The biofilm formation ability was performed in a 96-well microtiter plate assay according protocol described by Merritt et al. (2015) with some modifications. Briefly, each isolate was overnight grown in Muller-Hinton Agar (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), and then a bacterial suspension in Brain-Heart Infusion Broth

(Neogen Co., Lansing, MI, USA) was adjusting to a 0.5 McFarland scale. A 200 μ L aliquot of the bacterial suspension was dispensed in each well of a sterile 96-well polystyrene microtiter plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Wells containing only medium were used as negative control. After 24 hours at 37°C in static incubation, the plates were gently washed three times with phosphate-buffered saline and air-dried in an inverted position for 30 minutes. The biofilms were stained with 200 μ L of 0.1% crystal violet for 10 minutes and solubilised in 200 μ L of ethanol-acetone (80:20 v/v). The optical density of the supernatant 550nm was determined at 550nm using a microplate reader (Thermo Plate, Jacareí, SP, Brazil). Each assay was performed in quintuplicate at three independent times using fresh samples each time. The classification of non, weak, moderate, and strong biofilm producer were evaluated following Stepanovic et al. (2000) standards.

Statistical analysis

All frequency and percentage data were calculated with categorical variables using the SPSS program, version 22.0 (SPSS Inc., Armonk, NY, USA).

RESULTS

Bacterial isolates

A total of 103 non-duplicate MDR *A. baumannii* isolated from bloodstream were recovered in the Clinical Microbiology Laboratory of HU among the period of november of 2006 to december of 2016 as follows: one isolate of 2006, six of 2007, one of 2008, one of 2009, three of 2010, 13 of 2011, six of 2012, eight of 2013, 11 of 2014, 26 of 2015, and 27 of 2016. The samples were mostly collected from patients located in intensive care unit, emergency, ward, burn unit, and neonatology care unit. Of the 103 patients, the median age was 60 years ranging from 16 days to 94 years and the infections affected more male patients (70.9%). Overall, MDR and XDR frequency of patient gender, age, admit unit, duration of hospitalization, and outcome are shown in the Table 1. All the isolates were identified as *A. baumannii* by the positive amplification of *bla*_{OXA-51-like} and *rpoB*.

TABLE 1 - Clinical characteristics of the patients with *A. baumannii* isolated from bloodstream.

Clinical Characteristics	Overall frequency % (n=103)	MDR^a frequency % (n=22)	XDR^b frequency % (n=81)
Gender %(n)			
Male	70.9 (73)	68.2 (15)	71.6 (58)
Female	29.1 (30)	31.8 (7)	28.4 (23)
Age %(n)			
0-20 years	4.9 (5)	0.0 (0)	6.1 (5)
21-40 years	16.5 (17)	13.6 (3)	17.3 (14)
41-60 years	33.0 (34)	41.0 (9)	30.9 (25)
≥61 years	45.6 (47)	45.4 (10)	45.7 (37)
Patient admit unit % (n)			
Burn unit	17.5 (18)	18.2 (4)	17.3 (14)
Emergency	22.3 (23)	31.8 (7)	19.8 (16)
Intensive care unit	34.0 (35)	31.8 (7)	34.6 (28)
Neonatology care unit	1.9 (2)	0.0 (0)	2.5 (2)
Ward	24.3 (25)	18.2 (4)	25.9 (21)
Duration of hospitalization in days (n)			
Median (range)	28 (1-315)	22 (2-71)	29 (1-315)
Median before bacterial isolation in days (range)	15 (1-244)	10 (1-12)	16 (1-244)
Patient outcome %(n)			
Discharged	18.4 (19)	22.7 (5)	17.3 (14)
Intrahospital death	81.6 (84)	77.3 (17)	82.7 (67)

^amultidrug-resistant; ^b extensively drug-resistant.

Antimicrobial resistance patterns

The antimicrobial susceptibility profiles of the 103 *A. baumannii* isolates are presented in Table 2. Most of the isolates were classified as XDR (78.6%) following by MDR (21.4%). None isolate was classified as pan-resistant. MIC₅₀ (to inhibit 50% of the isolates) and MIC₉₀ (to inhibit 90% of the isolates) values of ceftazidime, imipenem, meropenem, polymyxin B, colistin and tigecycline are shown in Table 3.

TABLE 2 - Antimicrobial susceptibility profile of the *A. baumannii* isolated from bloodstream.

Antimicrobials	Sensitive % (n)	Intermediate % (n)	Resistant % (n)
Amikacin	51.5 (53)	6.8 (7)	41.7 (43)
Gentamicin	27.2 (28)	2.9 (3)	69.9 (72)
Ciprofloxacin	0.0 (0)	0.0 (0)	100.0 (103)
Levofloxacin	0.0 (0)	3.9 (4)	96.1 (99)
Trimethoprim- sulfamethoxazole	12.6 (13)	0.0 (0)	87.4 (90)
Tetracycline	38.8 (40)	28.2 (29)	33.0 (34)
Tigecycline	66.0 (68)	30.1 (31)	3.9 (4)
Colistin	89.3 (92)	0.0 (0)	10.7 (11)
Polymyxin B	89.3 (92)	0.0 (0)	10.7 (11)
Ampicillin-sulbactam	9.7 (10)	33.0 (34)	57.3 (59)
Piperacillin- tazobactam	1.0 (1)	3.9 (4)	95.1 (98)
Cefotaxime	0.0 (0)	0.0 (0)	100 (103)
Ceftazidime	0.0 (0)	0.0 (0)	100 (103)
Cefepime	0.0 (0)	1.0 (1)	99.0 (102)
Imipenem	7.8 (8)	0.0 (0)	92.2 (95)
Meropenem	7.8 (8)	0.0 (0)	92.2 (95)

TABLE 3 - Minimum inhibitory concentration of ceftazidime, carbapenems, polymyxins and tigecycline for *A. baumannii* isolates.

Antimicrobials	MIC₅₀^a (µg/mL)	MIC₉₀^b (µg/mL)	Resistant range
Ceftazidime	128.0	>512.0	16.0 – >512.0
Imipenem	64.0	128.0	16.0 – 128.0
Meropenem	64.0	128.0	32.0 – 128.0
Colistin	1.0	2.0	4.0 – ≥64.0
Polymixin B	1.0	2.0	4.0 – 32.0
Tigecycline	2.0	4.0	4.0 – 8.0

^a minimum inhibitory concentration to inhibit 50% of the isolates; ^b minimum inhibitory concentration to inhibit 90% of the isolates.

Phenotypic detection of carbapenemases

Carbapenemase production was found in 95 (92.2%) isolates, while only 8 (7.8%) were negative.

Antimicrobial determinants of resistance screening

The antimicrobial resistance genes *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, *bla*_{GES}, *mcr-1*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, and *qnrVc* were not detected in none isolate. Positive results were only detected to *bla*_{OXA-51-like} and the CHDL *bla*_{OXA-23-like} and *bla*_{OXA-143-like}. All *A. baumannii* were positive for *bla*_{OXA-51-like}; moreover, every carbapenem-resistant *A. baumannii* were positive either for *bla*_{OXA-23-like} or *bla*_{OXA-143-like}. Among the 95 carbapenem-resistant *A. baumannii*, the majority harbored *bla*_{OXA-23-like} (97.9%) and only 2 isolates harbored *bla*_{OXA-143-like} (2.1%). Sequencing analysis identified these two isolates being the *bla*_{OXA-253} variant which were classified as XDR, belonged to the same cluster and CC110/25, and were recovered in 2011 and 2016 from inpatients at intensive care unit and burn unit, respectively. The *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, and *bla*_{OXA-143-like} mean frequency, carbapenemase production, and resistance classification are demonstrated in Table 4.

TABLE 4 - Associations of carbapenemase production, resistance classification and clonal complexes with OXA genes profiles of *A. baumannii*.

Associations	<i>bla</i> _{OXA-23-like}	<i>bla</i> _{OXA-143-like}	<i>bla</i> _{OXA-51-like}
	<i>bla</i> _{OXA-51-like}	<i>bla</i> _{OXA-51-like}	
Carbapenemase Production %(n)			
Positive (95)	95.8 (91)	2.1 (2)	2.1 (2)
Negative (8)	25.0 (2)	0.0 (0)	75.0 (6)
Resistance Classification %(n)			
MDR ^a (22)	68.2 (15)	0.0 (0)	31.8 (7)
XDR ^b (81)	96.3 (78)	2.5 (2)	1.2 (1)
Clonal Complex % (n)			
CC113/79 (40)	90.0 (36)	0.0(0)	10.0 (4)
CC110/25 (21)	85.7 (18)	9.5 (2)	4.8 (1)
CC109/1 (20)	95.0 (19)	0.0 (0)	5.0 (1)
CC103/15 (11)	90.9 (10)	0.0 (0)	9.1 (1)

^a multidrug-resistant; ^b extensively drug-resistant.

Genetic context of *bla*_{OXA-23-like}

Sequencing analysis detected the presence of two different transposons harboring *bla*_{OXA-23-like}. The Tn2006 was predominant among the isolates,

representing 86.0%; while Tn2008 was found in 12.9%. Only one (1.1%) isolate was not positive for Tn2006, Tn2007, Tn2008 or Tn2009.

Molecular typing

The dendrogram analysis revealed 17 clusters, in which six were dominant, representing 87.3% of all isolates. The main clusters were H (22.3%), D (20.4%), O (13.6%), G (11.6%), I (11.6%), and M (7.8%) respectively. Nearly all isolates (89.3%) were identified as being one of the international clonal complex CC113/79, CC110/25, CC109/1, and CC103/15. The frequency of the clonal complexes found are presented in Table 5.

TABLE 5 - Frequency of international clonal complexes in *A. baumannii*.

Clonal Complexes	Mean %(n)	MDR ^a %(n)	XDR ^b %(n)
CC113/79	38.8 (40)	22.5 (9)	77.5 (31)
CC110/25	20.4 (21)	0.0 (0)	100 (21)
CC109/1	19.4 (20)	20.0 (4)	80.0 (16)
CC103/15	10.7 (11)	54.5 (6)	45.5 (5)
Others	10.7 (11)	27.3 (3)	72.7 (8)

^a multidrug-resistant; ^b extensively drug-resistant.

The temporal evolution of the clusters and the clonal complexes are demonstrated in the Figure 01 and Figure 02, respectively.

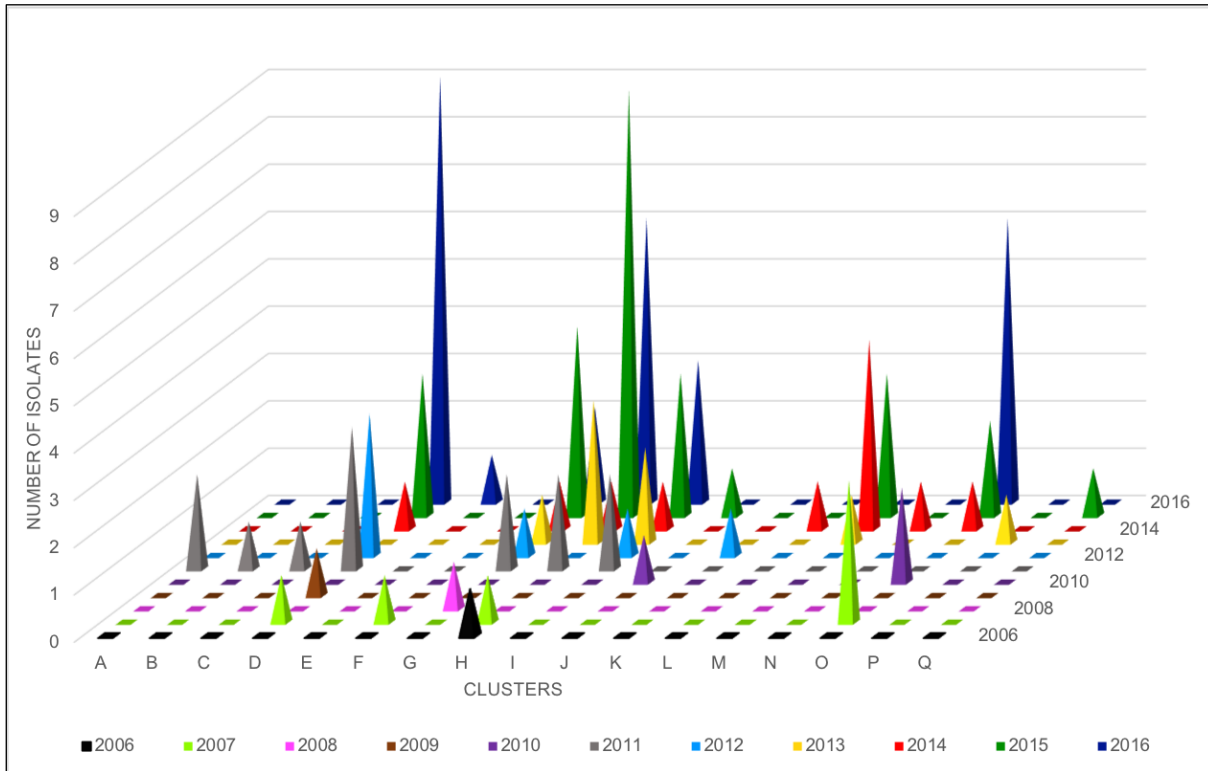


FIGURE 1 - Temporal evolution of *A. baumannii* clusters.

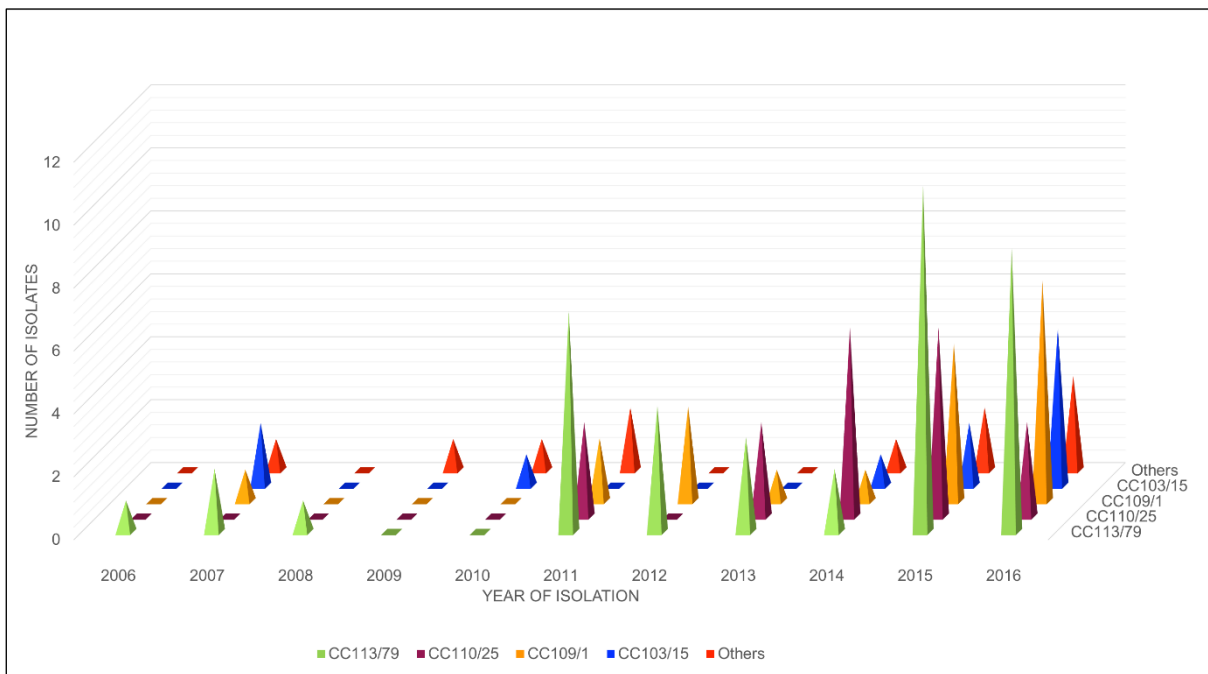


FIGURE 2 - Temporal evolution of *A. baumannii* clonal complexes.

The major epidemic cluster H included only *bla*_{OXA-23}-like isolates that were isolated in most of the years analyzed. A total of 87.0% isolates in this cluster

were (not all presented) XDR, belonged to the CC113/79, and harbored Tn2006. The isolates from cluster L were recovered from patients located in all units of the hospital.

The second most frequently cluster, D, was initially identified in 2007 and it was found in almost all the following years. The first isolate of this cluster, identified in 2007, harbored only *bla*_{OXA-51-like} while the majority of the isolates (90.5%) harbored *bla*_{OXA-23-like}. All the *bla*_{OXA-23-like} presented the Tn2006. Most of the isolates were XDR (76.2%) and belonged to CC109/1 (71.4%). The isolates from cluster J were also recovered from patients located in all units of the hospital.

The clinical and molecular characteristics of the major clusters H and D are shown in Table 6 and Table 7, respectively.

TABLE 6 - Clinical characteristics and molecular profile of the *A. baumannii* isolates in Cluster H.

Isolates	Year	Patient unit	S	T	C	C	F	I	M	C	L	A	C	S	T	C	P	T	<i>bla</i>	<i>bla</i> _{OXA-}	Clonal Complex	Clinical Outcome
			A M	Z P	T X	A Z	E P	P M	E M	I P	M P	C V	L V	A K	C N	S T	T E	C L	P B	T G		
Ac 211/15	2015	ICU	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 237/15	2015	ER	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 651/15	2015	BU	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	I	+	Tn2006	CC113/79	Discharged
Ac 697/15	2015	Ward	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 35	2006	ICU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	+	Tn2008	CC113/79	Death
Ac 77	2007	ICU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	I	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 18/14	2014	ICU	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 205/15	2015	BU	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	+	Tn2006	CC109/1	Death
Ac 667/15	2015	Ward	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	+	Tn2006	CC109/1	Death
Ac 687/15	2015	BU	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 238	2011	BU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	+	Tn2008	CC113/79	Death
Ac 1603	2013	BU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 374/16	2016	ICU	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 404/16	2016	NCU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	I	+	Tn2006	CC113/79	Discharged
Ac 598/15	2015	ER	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 620/15	2015	ER	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 235/16	2016	ER	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 648/16	2016	BU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 1427	2012	ER	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 167/16	2016	BU	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 209/16	2016	Ward	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	+	Tn2008	Other	Death
Ac 663	2011	Ward	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 1611	2013	ER	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	+	Tn2006	CC113/79	Death
Ac 1373	2012	BU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	R	+	Tn2006	CC113/79	Death

Legend: ICU: Intensive care unit; BU: Burn unit; ER: Emergency room; NCU: Neonatology care unit; SAM: Ampicillin-sulbactam; TZP: Piperacillin-tazobactam; CTX: Cefotaxime; CAZ: Ceftazidime; FEP: Cefepime; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; AK: Amikacin; CN: Gentamicin; SXT: Trimetoprim-sulfamethoxazole; CL: Colistin; PB: Polymyxin B; TE: Tetracycline; TGC: Tigecycline.

TABLE 7 - Clinical characteristics and molecular profile of the *A. baumannii* isolates in Cluster D.

Isolates	Year	Patient unit	S	T	C	C	F	I	M	C	L	A	C	S	T	C	P	T	<i>bla</i>	<i>bla</i> _{OXA-23-}	Clonal Complex	Clinical Outcome
			A M	Z P	T X	A Z	E P	P M	E M	I P	M P	C V	A K	C N	S X T	T E	C L	P B	T G C	OXA-23- like		
Ac 76	2007	Ward	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	I	S	S	S	-	-	CC109/1	Death
Ac 148/16	2016	ER	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	+	Tn2006	CC109/1	Death
Ac 568/15	2015	ER	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	I	+	Tn2006	CC109/1	Death
Ac 111/16	2016	ER	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	I	+	Tn2006	Other	Death
Ac 761	2011	ICU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I	+	Tn2006	CC109/1	Death
Ac 181/15	2015	Ward	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	S	S	I	+	Tn2006	CC109/1	Discharged
Ac 939	2012	ICU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	I	+	Tn2006	CC109/1	Death
Ac 666	2011	ER	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	+	Tn2006	CC109/1	Discharged
Ac 105/15	2015	BU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	I	+	Tn2006	CC109/1	Death
Ac 1185	2012	ICU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	+	Tn2006	CC109/1	Death
Ac 1018	2012	Ward	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	I	+	Tn2006	CC109/1	Death
Ac 603/14	2014	ICU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	I	+	Tn2006	Other	Death
Ac 219/16	2016	ICU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	I	+	Tn2006	CC109/1	Death
Ac 283/16	2016	Ward	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	I	+	Tn2006	CC109/1	Discharged
Ac 477/16	2016	Ward	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	+	Tn2006	CC109/1	Death
Ac 211/16	2016	ICU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	I	+	Tn2006	CC109/1	Death
Ac 533/16	2016	NCU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	+	Tn2006	Other	Discharged
Ac 201/16	2016	BU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	+	Tn2006	CC109/1	Death

Legend: ICU: Intensive care unit; BU: Burn unit; ER: Emergency room; NCU: Neonatology care unit; SAM: Ampicillin-sulbactam; TZP: Piperacillin-tazobactam; CTX: Cefotaxime; CAZ: Ceftazidime; FEP: Cefepime; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; AK: Amikacin; CN: Gentamicin; SXT: Trimetoprim-sulfamethoxazole; CL: Colistin; PB: Polymyxin B; TE: Tetracycline; TGC: Tigecycline.

Detection of *bap* and biofilm formation

A total of 83.5% of the *A. baumannii* isolates were positive for the *bap* gene. The frequency of this gene along the years is demonstrated in Figure 3.

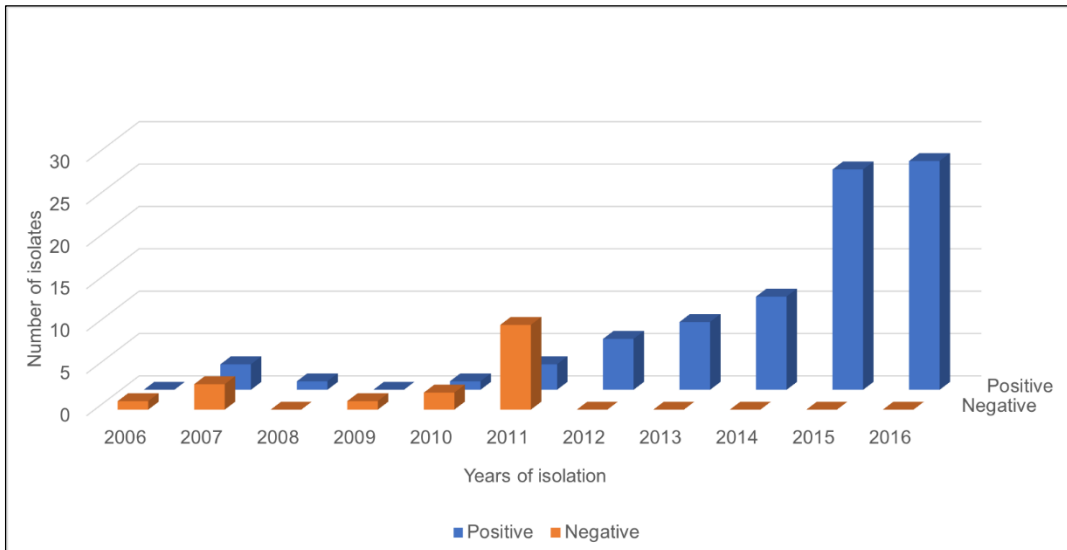


FIGURE 3 - Frequency of *bap* in *A. baumannii* isolates from bloodstream.

Biofilm formation was observed in 98.0% (n=101) of the *A. baumannii* isolates recovered from bloodstream. Most of the isolates were strong (86.4%) biofilm producer. The frequency of biofilm production of the isolates is demonstrated in Figure 4.

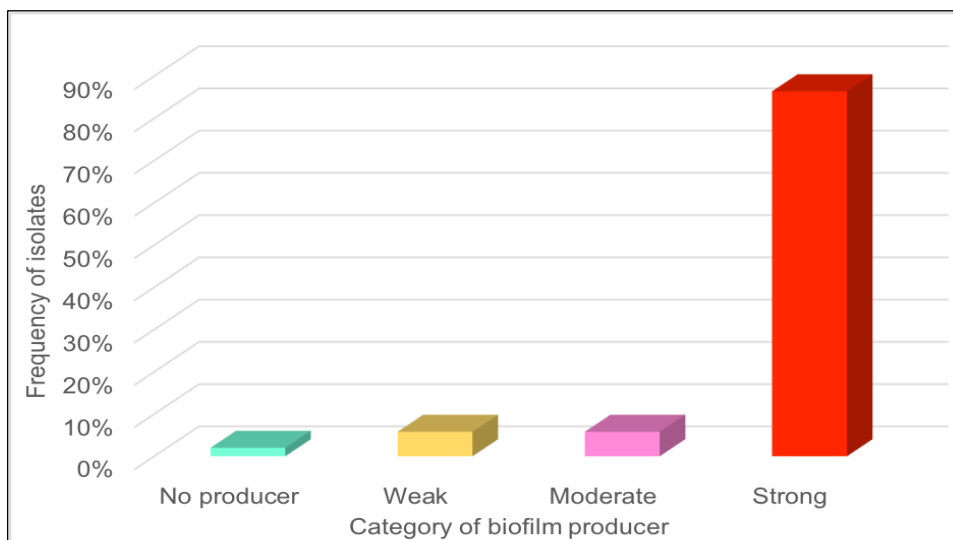


FIGURE 4 - Frequency of biofilm production among the *A. baumannii* isolated from bloodstream.

The biofilm capacity and associations regarding positive *bap* gene, resistance classification, and clonal complex are shown in Table 8.

TABLE 8 - Frequency of biofilm capacity associated with biofilm adhesion protein, resistance classification and clonal complex of *A. baumannii*.

Associations	No biofilm producer % (n=2)	Weak biofilm producer % (n=6)	Moderate biofilm producer % (n=6)	Strong biofilm producer % (n=89)
Biofilm adhesion protein (%)				
<i>bap</i> positive	100.0	83.3	100.0	80.9
Resistance Classification (%)				
MDR ^a	50.0	16.7	50.0	20.2
XDR ^b	50.0	83.3	50.0	79.8
Clonal Complex (%)				
CC113/79	0.0	16.7	66.6	39.3
CC110/25	0.0	50.0	16.7	19.1
CC109/1	0.0	16.7	16.7	20.2
CC103/15	100.0	0.0	0.0	10.1

^a multidrug-resistant; ^b extensively drug-resistant.

DISCUSSION

A. baumannii is one of the most successful pathogens in hospital settings associated with worldwide nosocomial outbreaks. One of the reasons for its success is the accumulation of several antimicrobial resistance mechanisms (HARDING et al., 2017). Bacteremia caused by *A. baumannii* is a major concern for patients and physicians because it affects the clinical outcome and are associated with considerable mortality, as high as 40.0% (GU et a., 2016). In Brazil, *A. baumannii* is the fourth most frequent microorganism causing bloodstream infections related with central venous catheter (ANVISA, 2016). In the present study, a total of 103 multi-drug resistant *A. baumannii* isolated from bloodstream of inpatients attended at HU, Southern Brazil, were evaluated.

The recovery frequency of *A. baumannii* from bloodstream was higher to male patients, with age ≥ 61 years, and the median hospitalization was 28 days. Most

of the isolates were recovered from patients located in the ICU, in accordance with similar studies reported (GU et al., 2016). In fact, several studies demonstrate that ICU stay, and duration of hospitalization are risk factors for *A. baumannii* infections (DOI et al., 2015). Even though epidemiological parameters were not evaluated, and mortality associated to *A. baumannii* infections could not be performed, higher intra-hospital death rates were observed in this study compared to recent studies developed in Israel and China (TAL-JASPER et al., 2016, GU et al., 2016).

The resistance classification of the isolates revealed alarming rates of XDR *A. baumannii*. Compared with other studies in Latin America, significant highest rates of XDR isolates were observed in this study (CASTILHO et al., 2017). None PDR *A. baumannii* was observed; indeed, all the isolates were susceptible to at least one antimicrobial drug available for clinical treatment. However, due to the extremely elevated rates of XDR isolates more restricted epidemiological measures should be applied to avoid the emergence of PDR isolates.

The majority of antimicrobials tested for *A. baumannii* isolates presented high antimicrobial non-susceptible rates in this study, as also observed in a Brazilian collection of carbapenem resistant isolates (DIAS et al., 2017). Lower rates were seen only for tigecycline and polymyxins. The polymyxins resistance rates are also in accordance with other studies in Brazil (VASCONCELOS et al., 2015; CASTILHO et al., 2017). Nevertheless, tigecycline non-susceptibility rates were higher than other studies reported in Latin America, including Brazil (SADER et al., 2016; CASTILHO et al., 2017). Carbapenem resistant MDR *A. baumannii* isolates represent a tough challenge for clinical treatment leaving only few therapeutic options such as polymyxins and tigecycline (CASTILHO et al., 2017). Polymyxins are antimicrobial drugs associated with neurotoxicity and nephrotoxicity and induce heteroresistance when administrated as monotherapy (POIREL et al., 2017). Furthermore, tigecycline is administrated mainly for intra-abdominal infections (SADER et al., 2016). Thus, the rise of resistance to these last resources antimicrobials is concerning to a future of untreatable infections.

In the latest report developed by Brazilian Health Surveillance Agency, *A. baumannii* represents the Gram-negative bacilli with highest rates of carbapenem-resistance in bloodstream infections related with central venous catheter (ANVISA, 2016). Phenotypic detection of carbapenemases is considered a reliable and inexpensive tool for rapid results in the routine of a microbiology laboratory (DORTET

et al., 2014). The CarbAcineto NP test has been described as more accurate with higher sensibility and specificity for carbapenemases, mainly CHDL, in *A. baumannii* isolates. Studies demonstrated that sensitivity of this method varied from 87.2% to 94.7% with specificity of 100.0% (MUÑOZ et al., 2017; DORTET et al., 2014). Carbapenemase production was observed in 92.2% of the isolates in this study. In accordance with this test, all the isolates carbapenem-resistant harbored one acquired CHDL, with major preponderance of *bla*_{OXA-23-like} (97.9%). *A. baumannii* harboring *bla*_{OXA-23-like} is the leading cause of carbapenem resistance around the world, including Brazil (PAGANO et al., 2016; CASTILHO et al., 2017). Even being predominant in Brazil, lower frequency of *bla*_{OXA-23-like} were observed in several states of Brazil compared with this study. In studies developed in Goiânia, Belo Horizonte, and Maringá with *A. baumannii* recovered from inpatients at ICU, the detection rates of *bla*_{OXA-23-like} in carbapenem-resistant isolates were 55.1% (CASTILHO et al., 2017), 51.2% (NEVES et al., 2016), and 71.0% (VIANA et al., 2016), respectively. Similar results were seen in a study analyzing carbapenem-resistant isolates recovered from three hospitals in Porto Alegre (100.0%) in 2011 (PAGANO et al., 2015), and in a Joinville hospital (91.0%) in clinical isolates of *A. baumannii* isolated from 2009 to 2015 (KOBBS et al., 2016).

Considering the huge number of *bla*_{OXA-23-like} isolates, the evaluation of the genetic context is fundamental to understand the successful spread of this gene and the increase of MIC values in our hospital. The predominance of Tn2006 (86.0%) indicates the successful adaptation of this mobile genetic element among the *bla*_{OXA-23-like} isolates in HU. Globally, Tn2006 is the genetic environment most reported (NIGRO; HALL, 2016). This transposon is flanked by IS*Aba*1 in opposite orientation contributing for increase of expression of *bla*_{OXA-23-like}, which might explain the increase of MIC values. The Tn2006 is also responsible for mobilization in the genome and related to replicative transposition, resulting in multiple copies of *bla*_{OXA-23-like} in the *A. baumannii* genome (NIGRO; HALL, 2016; HUA et al., 2016). Additionally, to Tn2006, Tn2008 was detected in 12.9% being most of isolates recovered before 2012. The Tn2008 contains IS*Aba*1 only upstream *bla*_{OXA-23-like}. The evidence of Tn2008 as a precursor of Tn2006 (NIGRO; HALL, 2016) is a possible explanation for prevalence of Tn2008 in the first years analyzed and also in the first isolate of the major cluster L.

The other acquired CHDL found in *A. baumannii* in lower frequency at HU is *bla*_{OXA-143-like}. The *bla*_{OXA-143} was first discovered in Brazil in *A. baumannii* isolated

from 2004 (HIGGINS et al., 2009). So far in this country, the only detected *bla*_{OXA-143}-like variants were *bla*_{OXA-143} (HIGGINS et al., 2009), *bla*_{OXA-231} (GIONCO et al., 2012), and *bla*_{OXA-253} (GIRLICH et al., 2014). In HU, only *bla*_{OXA-231} was noticed (GIONCO et al., 2012). However, the PCR product sequencing of the two isolates identified the *bla*_{OXA-253}. This gene was detected in *A. baumannii* isolated in Honduras (ZANDER et al., 2014) and Brazil, in Belo Horizonte (GIRLICH et al., 2014) and Recife (CAVALCANTI et al., 2016). Interestingly, the XDR phenotype of the *bla*_{OXA-253} harboring isolates in this study were also observed in 25 *A. baumannii* isolates in Recife (CAVALCANTI et al., 2016). To the best of our knowledge, this is the first report of *A. baumannii* isolates harboring *bla*_{OXA-253} in Southern Brazil.

The clonal relatedness and evaluation of international clonal complexes are essential to establish an evolution of possible outstanding epidemic clones. Silbert et al. (2004) reported ERIC-PCR as a reliable typing method for *A. baumannii* in local purposes. This method demonstrated that among the ten years analyzed, a polyclonal diversity of *A. baumannii* was observed; even though, six clusters gather most of the isolates. The major clusters H (22.3%) and D (20.4%) were characterized by isolates mostly harboring *bla*_{OXA-23-like}, presenting XDR phenotype, and recovered from patients in all hospital units. The patterns observed suggest the successful adaptation of these clusters along the years and in several hospital settings, and their dissemination might be occurred by transmission by medical staff, contaminated equipment, and patient transfer (CHEON et al., 2015).

The 3LST multiplex-PCR has been reported as a trustworthy powerful method for molecular evaluation of *A. baumannii* international epidemic clones (MARTINS et al., 2016; VASCONCELLOS et al., 2017). In Brazil, dissemination of *bla*_{OXA-23-like}-harboring *A. baumannii* is associated with the international epidemic clones 113/79, 109/1, 110/25, and 103/15 (CARDOSO et al., 2016; VASCONCELLOS et al., 2015), and all these clonal complexes were detected in HU. The main clonal complex CC113/79 has been related to MDR phenotype (VASCONCELOS et al., 2015). However, most of the CC113/79 isolates in this study presented a XDR phenotype. These findings are concerning to the emergence of this phenotype in Brazilian hospitals. Also, *A. baumannii* harboring *bla*_{OXA-253} were detected in CC110/25, which was observed in previous report (CAVALCANTI et al., 2016). The advances of internationally epidemic XDR clones harboring important antibiotic genes are alarming to the emergence of future untreatable infections. Epidemiology measures such as

antimicrobial stewardship and infection control continuously need to be applied and reinforced to contain the spread of these successful clinical isolates (CHEON et al., 2015).

Biofilm formation is a major virulence attribute associated with MDR *A. baumannii* (SELASI et al., 2016; BARDBARI et al., 2017; CHIANG et al., 2017). Consistent with this finding, a high proportion of the isolates in this study presented the ability to form biofilm (98.0%), and the majority of the isolates were strong biofilm producers. Moreover, the high frequency of *bap* (83.5%) of the isolates was similar to previous studies (BARDBARI et al., 2017). The capacity to form biofilm is demonstrated to contribute to the spread and persistence of *A. baumannii* in hospital equipments and environment (CHIANG et al., 2017). In patients, biofilm ability can hardly difficult the antibiotic treatment and it is concerning in bacteremia because it can be a constant colonization font in central venous catheter (BADAVE; DHANANJAY, 2015). Chiang et al. (2017) demonstrates that hand hygiene and disinfection strategies can significantly reduce the MDR *A. baumannii* biofilm population.

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first study at HU to evaluate the temporal evolution of *A. baumannii* by performing phenotypic and molecular characterization of MDR and XDR isolates. Here, we report extremely high rates of XDR isolates and alarming rates of polymyxin B, colistin and tigecycline resistance. Furthermore, our study has shown that carbapenemase production plays an important role in carbapenem resistance with high prevalence of *bla*_{OXA-23-like}, mainly inserted in Tn2006. Interestingly, our study has demonstrated that the epidemic international clonal complexes 113/79, 109/1, 110/25, and 103/15 were detected in most of the isolates; and biofilm formation plays an important virulence ability of the majority of the isolates.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank you the Dr. Ana Cristina Gales of Federal University of São Paulo, for providing the *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, and *bla*_{GIM} controls, and Dr. Renata Cristina Picão of Federal University of Rio de Janeiro for providing the *mcr-1* and *qnr* controls.

REFERENCES

ANVISA. Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência antimicrobiana no ano de 2015. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº14. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2016.

BADAVE, G.K.; DHANANJAY, K. Biofilm producing multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging challenge. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 1, p. 8-10, 2015.

BARDBARI, A.M. et al. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates. **Microbial Pathogenesis**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.039>

BROSSARD, K.A.; CAMPAGNARI, A.A. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. **Infection and Immunity**, 2011. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.05913-11>.

CASTILHO, S.R.A. et al. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: molecular and drug susceptibility profiles. **PLoS ONE**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176790>.

CAVALCANTI, F.L.S. et al. High frequency of OXA-253-producing *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. 1-3, 2016.

CHEN, Y.; GAO, J.; ZHANG, H.; YING, C. Spread of the *bla*_{OXA-23}-containing Tn2008 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates grouped in CC92 from China. **Frontiers in Microbiology**, 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00163>.

CHEON, S.; KIM, M.J.; YUN, S.J.; MOON, J.Y.; KIM, Y.S. Controlling endemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units using antimicrobial stewardship and infection control. **Korean J Intern Med.**, v. 31, p. 367-374, 2016. <http://dx.doi.org/10.3904/kjim.2015.178>

CHIANG, S.R. et al. Desiccation and ethanol resistances of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* embedded in biofilm: the favorable antiseptic efficacy of combination chlorhexidine gluconate and ethanol. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2017.02.003>.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – ninth edition, M07-A9. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 32, n. 2, Wayne, PA: CLSI; 2012.

CLSI. M100-S27 - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – twenty-seventh edition, -. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 37, n. 1, Wayne, PA: CLSI; 2017.

DIAS, V.C. et al. Epidemiological, physiological, and molecular characteristics of a Brazilian collection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Drug Resistance**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2016.0219>.

DOI, Y.; MURRAY, G.L.; PELEG, A.Y. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance – treatment options. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 36, p. 85-98, 2015. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1398388>.

DORTET, L. et al. CarbAcineto NP Test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2359-2364, 2014. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00594-14>.

DOYLE, D. et al. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877-3880, 2012. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02117-12>.

FDA. Food and Drug Administration NDA 21-821/S-016, (access in: 05/01/2018). https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/021821s016lbl.pdf.

GIONCO, B. *et al.* Detection of OXA-231, a new variant of *bla*_{OXA-143}, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2531-2532, 2012. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks223>.

GIRLICH, D. *et al.* OXA-253, a variant of the carbapenem-hydrolyzing class d β -lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p.2976-2978, 2014. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02640-13>.

GU, Z. *et al.* Risk factors and clinical outcomes for patients with *Acinetobacter baumannii* bacteremia. **Medicine**, v. 95, n. 9, p. 1-6, 2016. <http://dx.doi.org/10.1097/md.0000000000002943>.

HARDING, C.M.; HENNON, S.W.; FELDMAN, M.F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>.

HIGGINS, P. G. *et al.* OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5035-5038, 2009. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00856-09>.

HIGGINS, P. G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 3, p. 305-314, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.014>.

HUA, X.; SHU, J.; RUAN, Z.; YU, Y.; FENG, Y. Multiplication of *bla*_{OXA-23} is common in clinical *Acinetobacter baumannii*, but does not enhance carbapenem resistance.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkw310>.

IYER, R.; MOUSSA, S.H.; DURAND-REVILLE, T.F.; TOMMASI, R.; MILLER, A.A. *Acinetobacter baumannii* OmpA is a selective antibiotic permeant porin. **ACS Infectious Diseases**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00168>.

KAYE, K.S.; GALES, A.C; DUBOURG, G. Old antibiotics for multidrug-resistant pathogens: from in vitro activity to clinical outcomes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.020>.

KOBS, V.C. et al. The role of the genetic elements *bla_{OXA}* and *ISAba1* in the *Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 4, p. 433-440, 2016.

KODORI, M.; DOURAGHI, M.; YASERI, M.; RAHBAR, M. The impact of primer sets on detection of the gene encoding biofilm-associated protein (Bap) in *Acinetobacter baumannii*: in silico and in vitro analysis. **Lett Appl Microbiol.** , 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12717>.

KRAYCHETE, G.B.; BOTELHO, L.A.B.; CAMPANA, E.H.; PICÃO, R.C.; BONELLI, R.R. Updated multiplex PCR for detection of all six plasmid-mediated *qnr* gene families. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7524-7526, 2016.

LI, X.M. et al. Development and evaluation of species-specific PCR for detection of nine *Acinetobacter* species. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 46, n. 3, p. 270-278, 2016.

LIU, Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(15)00424-7).

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.

MARTINS, N. et al. A new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clones. **Infection, Genetics, and Evolution**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.031>.

MENDES, R. E. et al. Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time pcr assay and melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 544-547, 2006. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01728-06>.

MERRITT, J.H.; KADOURI, D.E.; O'TOOLE, G.A. Growing and analyzing static biofilms. **Curr Protoc Microbiol**, 2005. <http://dx.doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>.

MUNÓZ, C. et al. Test evaluation and strategy proposal to detect and to characterize carbapenemases-producing gram negative bacilli. **Rev Chilena Infectol.**, v. 34, n. 4, p. 326-332, 2017. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182017000400326>.

NEVES, F.C. et al. Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing *Acinetobacter baumannii* in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 556-563, 2016.

NIGRO, S.J.; HALL, R.M. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the oxa23 carbapenemase gene. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkv440>.

PAGANO, M.; BARIN, J.; MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. High endemic rates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates caused by the persistence of major clones in hospitals in a Brazilian city 5 years after an outbreak. **Infection Control**

& **Hospital Epidemiology**, v. 36, n. 7, p. 860-862, 2015. <http://dx.doi.org/10.1017/ice.2015.52>.

PAGANO, M.; MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-8, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.005>.

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 557-596, 2017.

RAIBLE, K.M. et al. Molecular characterization of β -lactamase genes in clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1186/s12941-017-0248-3>.

RAMANATHAN, S. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter*: risk factors and outcomes in veterans with spinal cord injuries and disorders. **American Journal of Infection Control**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2017.06.016>.

SADER, H.E. et al. Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centers: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011-2014). **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.021>.

SELASI, G.N. et al. Differences in biofilm mass, expression of biofilm-associated genes, and resistance to desiccation between epidemic and sporadic clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* sequence type 191. **PLoS ONE**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0162576>

SILBERT, S. et al. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 10, p. 847-851, 2004.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. **J Microbiol Methods**, v. 40, p. 175–179, 2000.

SUNG, J.Y.; KOO, S.H.; KIM, S.; KWON, G.C. Persistence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates harboring *bla*_{OXA-23} and *bap* for 5 years. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, n. 8, p. 1481-1489, 2016.

TAL-JASPER, R. et al. The clinical and epidemiological significance of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02656-15>.

TURTON, J.F. et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. **Journal of Clinical Microbiology**, 2006. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01021-06>.

VANEECHOUTTE, M. et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 11-15, 1995.

VASCONCELLOS, F.M. et al. Evaluation of a new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clonal complexes circulating in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.009>.

VASCONCELOS, A.T.B. et al. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.08.006>.

VIANA, G. F. et al. IS*Aba1*/*bla*_{OXA-23}: A serious obstacle to controlling the spread and treatment of *Acinetobacter baumannii* strains. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 5, p. 593-595, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2015.11.020>.

VILA-FARRÉS, X. et al. Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. **Scientific Reports**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-14972-y>.

VISCA, P.; SEIFERT, H.; TOWNER, K.J. *Acinetobacter* infection – an emerging threat to human health. **Life**, v. 63, n. 12, p. 1048-1054, 2011.

WANG, C. et al. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1261-1262, 2006. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl116>.

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organization**, 2017. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1

WOODFORD, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 4, p. 351-353, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>.

ZANDER, E.; BONNIN, R.A.; SEIFERT, H.; HIGGINS, P.G. Characterization of blaOXA-143 variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2704-2708, 2014. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02618-13>.

APÉNDICES

APÊNDICE A

Primers used in this study for molecular characterization of the *A. baumannii* isolates

Primer	Primer sequence (5' – 3')	AT ^a	Amplicon sizes (bp)	Reference
OXA-23 F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	52°C	501	WOODFORD et al., 2006
OXA-23 R	ATTTCTGACCGCATTTCAT			
OXA-24 F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA		246	
OXA-24 R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT			
OXA-51 F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG		353	
OXA-51 R	TGGATTGCACTTCATCTTGG			
OXA-58 F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG		599	
OXA-58 R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC			
OXA-143 F	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	52°C	149	HIGGINS et al. (2010)
OXA-143 R	TAATCTTGAGGGGGCCAACC			
IMP F	GAATAG(A/G)(A/G)TGGCTTAA(C/T)TCTC	53°C	188	MENDES et al., 2007
IMP R	CCAAAC(C/T)ACTA(A/G)GTTATC			
VIM F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC		382	
VIM R	AATGCGCAGCACCAGGATAG			
GIM F	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC		72	
GIM R	CGGAACGACCATTTGAATGG			
SIM-1 F	GTACAAGGGATTCGGCATCG		569	
SIM-1 R	TGGCCTGTTCCCATGTGAG			
SPM-1 F	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG		798	
SPM-1 R	CCTTTTCCGCGACCTTGATC			
NDM F	GCAGCTTGTGCGCCATGCGGGC	60°C	782	DOYLE et al., 2012
NDM R	GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT			
KPC F	TGTCACTGTATCGCCGTC		900	
KPC R	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC			
OXA-48 F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC		438	
OXA-48 R	CATCAAGTTCAACCCAACCG			
GES F	ATGCGCTTCATTCACGCAC	55°C	846	WANG et al., 2006
GES R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG			
MCR-1 F	CGGTCAGTCCGTTTGTTT	54°C	309	LIU et al., 2016
MCR-1 R	CTTGGTCGGTCTGTAGGG			
Abau F	CATAAACTGAGATAACTGGCTTGAACC	66°C	529	LI et al., 2016
AbauR	CGTCGACTTCACCTTTACCGTTAC			
F-Bap-C	ATGCCTGAGATACAAATTATTGCCAAGG	56°C	561	KODORI et al., 2017
R-Bap-C	ATAATC AGGTGCTGAAGAATCATCATTAC			
ERIC1R	GTGAATCCCCAGGAGCTTACA	40°C	-	SILBERT et al., 2004
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG			

^a Annealing temperature

Primer	Primer sequence (5' – 3')	AT ^a	Amplicon sizes (bp)	Reference	
OXA-143-F	CAGCATTCTACTCTACTTTC	50°C	762	This study	
OXA-143-R	TCATTACGAATAGAACCAG				
QnrAm F	AGAGGATTCTCACGCCAGG	58°C	580	KRAYCHETE et al., 2016	
QnrAm R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC				
QnrBm F	GGMATHGAAATTCGCCACTG		264		
QnrBm R	TTTGCYGYCCGCCAGTCGAA				
QnrCm F	GCGAATTTCCAAGGGGCAA		135		
QnrCm R	ACCCGTAATGTAAGCAGAGCAA				
QnrDm F	AGGTGTAGCATGTATGGAAAAGC		691		
QnrDm R	ACATTGGGGCATTAGGCGTT				
QnrSm F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT		428		
QnrSm R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG				
QnrVCm F	GAGYKTATGGTTTAGAYCCTCG		71		
QnrVCm R	TGTTCTGYTGCCACGARCA				
Tn2006 Int-P3	GTCTATCAGGAACCTTGCGCG	62°C	-	CHEN et al., 2016	
Tn2006 Int-P4	GCAAGGCTTTAGATGCAGAAGA	62°C	-		
Tn2007 Int-P6	ATTTGAACCCATCTATTGGC	56°C	-		
Tn2007 Int-P7	ACTCTCATATTTTTCTTGG	56°C	-		
Tn2006/8 Int-P5	GGCTCATTACAGTCAGGTACAAGT	62°C	-		
Tn2009 Int-P1	ATCCTGATGCTCGCAATCGT	62°C	-		
Tn2009 Int-P8	CTGTCTGCGAACACATTCAC	62°C	-		
ompA-FM	TGGCGGTAAAGATGGTAAC	57°C	327		MARTINS et al., 2016
ompA-RM	CCTAAAGTACCTTCTTCTGAGTTAC				
ompA-RBM	TTCCAGAACTCTTCATCAGC		423		
csuE-FM	CGATTGTGGGAATCGGTGCC		239		
csuE-FBM	TTGGCGAACATGACCTATT		531		
csuE-RM	CACATAATATGGTGTATTTACCGAA		-		
OXA-51FM	AGTATTTAAGTGGGACGGGC		114		
OXA-51RM	CGACGAGCTAAATCTTGATAAACC				

^a Annealing temperature

CHEN, Y.; GAO, J.; ZHANG, H.; YING, C. Spread of the *bla*_{OXA-23}-containing Tn2008 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates grouped in CC92 from China. **Frontiers in Microbiology**, 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00163>.

DOYLE, D. et al. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877-3880, 2012. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02117-12>.

HIGGINS, P. G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 3, p. 305-314, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.014>.

KODORI, M.; DOURAGHI, M.; YASERI, M.; RAHBAR, M. The impact of primer sets on detection of the gene encoding biofilm-associated protein (Bap) in *Acinetobacter baumannii*: in silico and in vitro analysis. **Lett Appl Microbiol.**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12717>.

KRAYCHETE, G.B.; BOTELHO, L.A.B.; CAMPANA, E.H.; PICÃO, R.C.; BONELLI, R.R. Updated multiplex PCR for detection of all six plasmid-mediated *qnr* gene families. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7524-7526, 2016.

LI, X.M. et al. Development and evaluation of species-specific PCR for detection of nine *Acinetobacter* species. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 46, n. 3, p. 270-278, 2016.

LIU, Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(15)00424-7).

MARTINS, N. et al. A new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clones. **Infection, Genetics, and Evolution**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.031>.

MENDES, R. E. et al. Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time pcr assay and melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 544-547, 2006. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01728-06>.

SILBERT, S. et al. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 10, p. 847-851, 2004.

WANG, C. et al. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1261-1262, 2006. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl116>.

WOODFORD, N.; FAGAN, E.J.; ELLINGTON, M.J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2005. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki412>.

APÊNDICE B

Clinical and molecular characteristics of *A. baumannii* isolated from bloodstream

Isolate	Resistance profile							Non-susceptible antimicrobial profile	<i>bla</i> _{OXA} -type gene	<i>bla</i> _{OXA} -23 context	CC	ERIC profile	Patient location	Isolation data	Patient outcome
	CAZ	IPM	MIC (µg/mL)			CL	TGC								
			MEM	PB											
Ac 35	512.0	64.0	64.0	<0.25	0.5	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2008	113/79	H9	ICU	2006	Death
Ac 70	32.0	0.5	<0.5	0.5	0.5	0.25	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, CIP, LEV, AK, CN, SXT	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -51-like	NA	113/79	F1	Ward	2007	Discharged
Ac 76	64.0	2.0	2.0	1.0	1.0	0.5	TZP, CTX, CAZ, FEP, CIP, LEV, AK, CN, TE	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -51-like	NA	109/1	D5	Ward	2007	Death
Ac 77	512.0	64.0	64.0	0.5	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, IPM, MEM, FEP, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H10	ICU	2007	Death
Ac 84	>512.0	128.0	128.0	8.0	16.0	2.0	SAM, PTZ, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, CL, PB, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	Other	O4	Ward	2007	Death
Ac 91	512.0	128.0	128.0	2.0	2.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	103/15	O4	Ward	2007	Death
Ac 114	>512.0	64.0	64.0	1.0	1.0	0.5	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	103/15	O4	ICU	2007	Death
Ac 122	128.0	2.0	2.0	1.0	1.0	4.0	TZP, CTX, CAZ, FEP, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE, TGC	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -51-like	NA	113/79	G6	Ward	2008	Discharged
Ac 169	>512.0	64.0	64.0	1.0	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	Other	D12	Ward	2009	Death
Ac 198	>512.0	64.0	128.0	2.0	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2008	Other	J1	ICU	2010	Death
Ac 210	>512.0	128.0	128.0	8.0	16.0	4.0	TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, CL, PB, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2008	103/15	O2	BU	2010	Death
Ac 212	>512.0	64.0	64.0	2.0	2.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, TE	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	Other	D13	ICU	2011	Death

SAM – Ampicillin-sulbactam; TZP – Piperacillin-tazobactam; CTX – Cefotaxime; CAZ – Ceftazidime; FEP – Cefepime; IPM – Imipenem; MEM – Meropenem; CIP – Ciprofloxacin; LEV – Levofloxacin; AK – Amikacin; CN – Gentamicin; SXT – Trimetoprim-sulfamethoxazole; CL – Colistin; PB – Polymyxin B; TE – Tetracycline; TGC – Tigecycline; CC – Clonal Complex; BU – Burn unit; ER – Emergency Room; ICU – Intensive care unit; MIC – Minimum inhibitory concentration; NA – Not applicable; ND – Not detected; XDR – Extensively resistant; MDR – Multidrug-resistant.

Isolate	MIC (µg/mL)		Resistance profile				<i>bla</i> _{OXA-type} gene	<i>bla</i> _{OXA-23} context	CC	ERIC profile	Patient location	Isolation data	Patient outcome		
	CAZ	IPM	MEM	PB	CL	TGC								Non-susceptible antimicrobial profile	
Ac 227	>512.0	128.0	128.0	8.0	16.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, CL, PB, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA-23-like} / <i>bla</i> _{OXA-51-like}	Tn2008	Other	O1	Ward	2011	Death
Ac 236	256.0	128.0	128.0	0.25	1.0	0.5	TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA-23-like} / <i>bla</i> _{OXA-51-like}	Tn2006	110/25	I3	BU	2011	Death
Ac 238	64.0	64.0	64.0	1.0	1.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA-23-like} / <i>bla</i> _{OXA-51-like}	Tn2008	113/79	H1	BU	2011	Death
Ac 293	64.0	64.0	64.0	2.0	0.5	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA-23-like} / <i>bla</i> _{OXA-51-like}	Tn2008	113/79	A1	ER	2011	Death
Ac 328	64.0	64.0	64.0	0.25	1.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA-23-like} / <i>bla</i> _{OXA-51-like}	Tn2008	113/79	A2	ICU	2011	Death
Ac 391	256.0	32.0	64.0	0.5	0.5	<0.25	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA-143-like} / <i>bla</i> _{OXA-51-like}	NA	110/25	I5	ICU	2011	Death
Ac 503	256.0	64.0	64.0	0.5	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA-23-like} / <i>bla</i> _{OXA-51-like}	Tn2008	110/25	B1	ICU	2011	Death
Ac 663	128.0	128.0	128.0	1.0	1.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA-23-like} / <i>bla</i> _{OXA-51-like}	Tn2006	113/79	H3	Ward	2011	Death
Ac 666	512.0	64.0	64.0	0.5	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA-23-like} / <i>bla</i> _{OXA-51-like}	Tn2006	109/1	D7	ER	2011	Death
Ac 679	>512.0	32.0	64.0	0.5	0.5	<0.25	TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT	MDR	<i>bla</i> _{OXA-23-like} / <i>bla</i> _{OXA-51-like}	Tn2006	113/79	C1	ER	2011	Death
Ac 761	64.0	32.0	32.0	0.25	2.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, TGC	MDR	<i>bla</i> _{OXA-23-like} / <i>bla</i> _{OXA-51-like}	Tn2006	109/1	D1	ICU	2011	Death

SAM – Ampicillin-sulbactam; TZP – Piperacillin-tazobactam; CTX – Cefotaxime; CAZ – Ceftazidime; FEP – Cefepime; IPM – Imipenem; MEM– Meropenem; CIP – Ciprofloxacin; LEV – Levofloxacin; AK – Amikacin; CN – Gentamicin; SXT – Trimetoprim-sulfamethoxazole; CL – Colistin; PB – Polymyxin B; TE – Tetracycline; TGC – Tigecycline; CC – Clonal Complex; BU – Burn unit; ER – Emergency Room; ICU – Intensive care unit; MIC – Minimum inhibitory concentration; NA – Not applicable; ND – Not detected; XDR – Extensively resistant; MDR – Multidrug-resistant.

Isolate	MIC (µg/mL)				Resistance profile				<i>bla</i> _{OXA} -type gene	<i>bla</i> _{OXA} -23 context	CC	ERIC profile	Patient location	Isolation data	Patient outcome
	CAZ	IPM	MEM	PB	CL	TGC	Non-susceptible antimicrobial profile								
Ac 804	128.0	64.0	64.0	0.25	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	G4	ER	2011	Death
Ac 939	128.0	128.0	64.0	0.25	0.5	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	D4	ICU	2012	Death
Ac 1018	256.0	64.0	64.0	0.25	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	D10	Ward	2012	Death
Ac 1050	>512.0	128.0	128.0	1.0	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	G5	BU	2012	Death
Ac 1155	>512.0	128.0	128.0	1.0	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT, TGC	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	K1	BU	2012	Death
Ac 1185	128.0	64.0	64.0	2.0	2.0	0.25	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	D4	ICU	2012	Death
Ac 1373	512.0	128.0	128.0	1.0	1.0	8.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	I7	BU	2012	Death
Ac 1427	128.0	64.0	64.0	1.0	0.5	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H6	ER	2012	Death
Ac 1480	>512.0	64.0	64.0	1.0	1.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	G3	ICU	2013	Death
Ac 1494	128.0	64.0	64.0	2.0	2.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	P1	ER	2013	Death
Ac 1578	256.0	32.0	32.0	1.0	0.5	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2008	110/25	I3	Ward	2013	Death

SAM – Ampicillin-sulbactam; TZP – Piperacillin-tazobactam; CTX – Cefotaxime; CAZ – Ceftazidime; FEP – Cefepime; IPM – Imipenem; MEM – Meropenem; CIP – Ciprofloxacin; LEV – Levofloxacin; AK – Amikacin; CN – Gentamicin; SXT – Trimetoprim-sulfamethoxazole; CL – Colistin; PB – Polymyxin B; TE – Tetracycline; TGC – Tigecycline; CC – Clonal Complex; BU – Burn unit; ER – Emergency Room; ICU – Intensive care unit; MIC – Minimum inhibitory concentration; NA – Not applicable; ND – Not detected; XDR – Extensively resistant; MDR – Multidrug-resistant.

Isolate	Resistance profile						Non-susceptible antimicrobial profile	<i>bla</i> _{OXA} -type gene	<i>bla</i> _{OXA} -23 context	CC	ERIC profile	Patient location	Isolation data	Patient outcome	
	CAZ	IPM	MIC (µg/mL)		CL	TGC									
			MEM	PB											
Ac 1583	128.0	64.0	64.0	2.0	2.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2008	110/25	I3	ICU	2013	Discharged
Ac 1603	128.0	64.0	128.0	0.5	1.0	8.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H2	BU	2013	Death
Ac 1611	128.0	128.0	128.0	0.5	0.5	8.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H3	ER	2013	Death
Ac 1613	64.0	64.0	64.0	16.0	32.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT, CL, PB, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	110/25	M2	ICU	2013	Discharged
Ac 02/14	128.0	32.0	64.0	1.0	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	L1	Ward	2014	Death
Ac 03/14	>512.0	16.0	32.0	0.25	1.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	G3	Ward	2014	Discharged
Ac 18/14	64.0	128.0	64.0	2.0	2.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H7	ICU	2014	Death
Ac 37/14	32.0	128.0	64.0	4.0	4.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, CL, PB, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	110/25	M4	ICU	2014	Death
Ac 229/14	32.0	64.0	64.0	32.0	>32.0	2.0	TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT, CL, PB, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	110/25	N1	Ward	2014	Death
Ac 256/14	256.0	64.0	64.0	0.5	1.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2008	110/25	I4	ER	2014	Death
Ac 278/14	64.0	64.0	64.0	32.0	≥64.0	0.5	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, SXT, CL, PB, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	110/25	M3	ICU	2014	Death

SAM – Ampicillin-sulbactam; TZP – Piperacillin-tazobactam; CTX – Cefotaxime; CAZ – Ceftazidime; FEP – Cefepime; IPM – Imipenem; MEM– Meropenem; CIP – Ciprofloxacin; LEV – Levofloxacin; AK – Amikacin; CN – Gentamicin; SXT –Trimetoprim-sulfamethoxazole; CL – Colistin; PB – Polymyxin B; TE – Tetracycline; TGC – Tigecycline; CC – Clonal Complex; BU – Burn unit; ER – Emergency Room; ICU – Intensive care unit; MIC – Minimum inhibitory concentration; NA – Not applicable; ND – Not detected; XDR – Extensively resistant; MDR – Multidrug-resistant.

Isolate	Resistance profile						<i>bla</i> _{OXA} -type gene	<i>bla</i> _{OXA} -23 context	CC	ERIC profile	Patient location	Isolation data	Patient outcome		
	CAZ	IPM	MIC (µg/mL)		CL	TGC								Non-susceptible antimicrobial profile	
			MEM	PB											
Ac 284/14	>512.0	128.0	128.0	0.5	1.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	103/15	O7	ICU	2014	Death
Ac 447/14	128.0	64.0	64.0	1.0	1.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	110/25	M1	BU	2014	Discharged
Ac 482/14	64.0	64.0	64.0	16.0	>32.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT, CL, PB, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	110/25	M2	Ward	2014	Death
Ac 603/14	128.0	128.0	128.0	1.0	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	Other	D11	ICU	2014	Death
Ac 35/15	32.0	<0.5	0.5	1.0	1.0	<0.25	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, CIP, LEV, CN, SXT	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	Other	Q1	BU	2015	Discharged
Ac 105/15	128.0	128.0	128.0	1.0	0.5	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	D7	BU	2015	Death
Ac 167/15	>512.0	64.0	64.0	1.0	0.5	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	G2	Ward	2015	Discharged
Ac 181/15	128.0	64.0	64.0	0.5	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	D1	Ward	2015	Discharged
Ac 194/15	32.0	64.0	64.0	8.0	16.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT, CL, PB, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	110/25	M2	ER	2015	Death
Ac 205/15	256.0	32.0	32.0	1.0	0.5	0.25	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	H11	BU	2015	Death
Ac 211/15	>512.0	64.0	64.0	1.0	1.0	2.0	SAM, PTZ, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H8	ICU	2015	Death

SAM – Ampicillin-sulbactam; TZP – Piperacillin-tazobactam; CTX – Cefotaxime; CAZ – Ceftazidime; FEP – Cefepime; IPM – Imipenem; MEM – Meropenem; CIP – Ciprofloxacin; LEV – Levofloxacin; AK – Amikacin; CN – Gentamicin; SXT – Trimetoprim-sulfamethoxazole; CL – Colistin; PB – Polymyxin B; TE – Tetracycline; TGC – Tigecycline; CC – Clonal Complex; BU – Burn unit; ER – Emergency Room; ICU – Intensive care unit; MIC – Minimum inhibitory concentration; NA – Not applicable; ND – Not detected; XDR – Extensively resistant; MDR – Multidrug-resistant.

Isolate	Resistance profile						Non-susceptible antimicrobial profile	<i>bla</i> _{OXA} -type gene	<i>bla</i> _{OXA} -23 context	CC	ERIC profile	Patient location	Isolation data	Patient outcome	
	CAZ	IPM	MIC (µg/mL)		CL	TGC									
			MEM	PB											
Ac 228/15	256.0	64.0	64.0	1.0	1.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	110/25	I3	Ward	2015	Discharged
Ac 237/15	>512.0	128.0	64.0	1.0	2.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H8	ER	2015	Death
Ac 527/15	>512.0	32.0	64.0	1.0	1.0	<0.25	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	G1	ICU	2015	Death
Ac 559/15	>512.0	128.0	128.0	2.0	0.5	0.25	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	110/25	I3	Ward	2015	Death
Ac 568/15	128.0	64.0	64.0	2.0	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	D6	ER	2015	Death
Ac 598/15	64.0	128.0	128.0	0.5	1.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H6	ER	2015	Death
Ac 620/15	>512.0	128.0	64.0	0.5	1.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H6	ER	2015	Death
Ac 630/15	>512.0	64.0	64.0	2.0	2.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	J2	ICU	2015	Death
Ac 651/15	>512.0	64.0	64.0	1.0	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H8	BU	2015	Discharged
Ac 659/15	256.0	128.0	128.0	1.0	1.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	110/25	I6	ICU	2015	Discharged
Ac 667/15	128.0	128.0	128.0	0.5	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	H11	Ward	2015	Death

SAM – Ampicillin-sulbactam; TZP – Piperacillin-tazobactam; CTX – Cefotaxime; CAZ – Ceftazidime; FEP – Cefepime; IPM – Imipenem; MEM – Meropenem; CIP – Ciprofloxacin; LEV – Levofloxacin; AK – Amikacin; CN – Gentamicin; SXT – Trimetoprim-sulfamethoxazole; CL – Colistin; PB – Polymyxin B; TE – Tetracycline; TGC – Tigecycline; CC – Clonal Complex; BU – Burn unit; ER – Emergency Room; ICU – Intensive care unit; MIC – Minimum inhibitory concentration; NA – Not applicable; ND – Not detected; XDR – Extensively resistant; MDR – Multidrug-resistant.

Isolate	Resistance profile						Non-susceptible antimicrobial profile	<i>bla</i> _{OXA} -type gene	<i>bla</i> _{OXA} -23 context	CC	ERIC profile	Patient location	Isolation data	Patient outcome	
	CAZ	IPM	MIC (µg/mL)		CL	TGC									
			MEM	PB											
Ac 673/15	32.0	64.0	64.0	2.0	2.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	110/25	M1	ICU	2015	Discharged
Ac 681/15	32.0	128.0	128.0	32.0	>32.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, SXT, CL, PB, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	110/25	M2	ICU	2015	Death
Ac 683/15	>512.0	32.0	64.0	0.5	0.5	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	Other	G1	ICU	2015	Death
Ac 687/15	128.0	128.0	128.0	2.0	0.5	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H4	BU	2015	Death
Ac 689/15	>512.0	64.0	64.0	2.0	0.5	0.25	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	103/15	O5	ICU	2015	Death
Ac 690/15	>512.0	64.0	64.0	1.0	0.5	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	G2	ER	2015	Death
Ac 697/15	>512.0	64.0	64.0	1.0	0.5	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H8	Ward	2015	Death
Ac 703/15	128.0	64.0	64.0	16.0	32.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT, CL, PB, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	103/15	O1	ER	2015	Death
Ac 31/16	>512.0	2.0	2.0	0.5	1.0	1.0	TZP, CTX, CAZ, FEP, CIP, LEV, SXT	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -51-like	NA	103/15	O6	ER	2016	Discharged
Ac 85/16	>512.0	1.0	0.5	1.0	1.0	4.0	TZP, CTX, CAZ, FEP, CIP, LEV, CN, SXT, TE, TGC	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -51-like	NA	113/79	G2	ER	2016	Death
Ac 111/16	128.0	64.0	128.0	1.0	1.0	4.0	TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT, TE, TGC	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	Other	D1	ER	2016	Death
Ac 118/16	32.0	128.0	128.0	1.0	0.5	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, TE	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	O1	ICU	2016	Death
Ac 125/16	>512.0	32.0	64.0	1.0	2.0	1.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	G1	ER	2016	Death

SAM – Ampicillin-sulbactam; TZP – Piperacillin-tazobactam; CTX – Cefotaxime; CAZ – Ceftazidime; FEP – Cefepime; IPM – Imipenem; MEM – Meropenem; CIP – Ciprofloxacin; LEV – Levofloxacin; AK – Amikacin; CN – Gentamicin; SXT – Trimetoprim-sulfamethoxazole; CL – Colistin; PB – Polymyxin B; TE – Tetracycline; TGC – Tigecycline; CC – Clonal Complex; BU – Burn unit; ER – Emergency Room; ICU – Intensive care unit; MIC – Minimum inhibitory concentration; NA – Not applicable; ND – Not detected; XDR – Extensively resistant; MDR – Multidrug-resistant.

Isolate	MIC (µg/mL)		Resistance profile				Non-susceptible antimicrobial profile	<i>bla</i> _{OXA} -type gene	<i>bla</i> _{OXA} -23 context	CC	ERIC profile	Patient location	Isolation data	Patient outcome	
	CAZ	IPM	MEM	PB	CL	TGC									
Ac 133/16	32.0	64.0	64.0	1.0	2.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, TE	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	103/15	O2	ICU	2016	Death
Ac 148/16	128.0	64.0	64.0	1.0	1.0	0.25	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	D5	ER	2016	Death
Ac 149/16	32.0	64.0	64.0	1.0	1.0	0.5	TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -143-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	NA	110/25	I2	BU	2016	Death
Ac 167/16	64.0	64.0	64.0	2.0	2.0	0.5	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H6	BU	2016	Death
Ac 201/16	256.0	32.0	64.0	2.0	2.0	8.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	D8	BU	2016	Death
Ac 209/16	32.0	64.0	64.0	1.0	1.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2008	Other	H6	Ward	2016	Death
Ac 211/16	128.0	128.0	128.0	0.5	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	D3	ICU	2016	Death
Ac 219/16	256.0	64.0	64.0	1.0	0.5	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	D2	ICU	2016	Death
Ac 227/16	256.0	64.0	64.0	1.0	2.0	1.0	TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	ND	110/25	I6	ICU	2016	Death
Ac 235/16	32.0	32.0	32.0	1.0	1.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H6	ER	2016	Death
Ac 283/16	256.0	128.0	128.0	1.0	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, CN, SXT, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	D2	Ward	2016	Discharged
Ac 344/16	64.0	128.0	128.0	1.0	1.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, TE	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	103/15	O8	ER	2016	Death
Ac 368/16	16.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -51-like	NA	110/25	D14	BU	2016	Discharged

SAM – Ampicillin-sulbactam; TZP – Piperacillin-tazobactam; CTX – Cefotaxime; CAZ – Ceftazidime; FEP – Cefepime; IPM – Imipenem; MEM – Meropenem; CIP – Ciprofloxacin; LEV – Levofloxacin; AK – Amikacin; CN – Gentamicin; SXT – Trimetoprim-sulfamethoxazole; CL – Colistin; PB – Polymyxin B; TE – Tetracycline; TGC – Tigecycline; CC – Clonal Complex; BU – Burn unit; ER – Emergency Room; ICU – Intensive care unit; MIC – Minimum inhibitory concentration; NA – Not applicable; ND – Not detected; XDR – Extensively resistant; MDR – Multidrug-resistant.

Isolate	Resistance profile						Non-susceptible antimicrobial profile	<i>bla</i> _{OXA} -type gene	<i>bla</i> _{OXA} -23 context	CC	ERIC profile	Patient location	Isolation data	Patient outcome	
	CAZ	IPM	MIC (µg/mL)		CL	TGC									
			MEM	PB											
Ac 374/16	64.0	64.0	64.0	1.0	1.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H5	ICU	2016	Death
Ac 404/16	32.0	128.0	128.0	1.0	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H5	NCU	2016	Discharged
Ac 426/16	32.0	128.0	64.0	1.0	0.5	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK	MDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	103/15	O8	ER	2016	Death
Ac 477/16	128.0	64.0	64.0	1.0	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	109/1	D9	Ward	2016	Death
Ac 505/16	>512.0	64.0	64.0	2.0	2.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	E1	Ward	2016	Death
Ac 533/16	256.0	128.0	128.0	1.0	1.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TE	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	Other	D3	NCU	2016	Discharged
Ac 583/16	128.0	128.0	128.0	0.5	1.0	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, CN, SXT, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	I1	Ward	2016	Death
Ac 623/16	32.0	128.0	128.0	1.0	0.5	4.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, TE, TGC	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	103/15	O3	ICU	2016	Death
Ac 648/16	64.0	128.0	128.0	1.0	1.0	2.0	SAM, TZP, CTX, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, LEV, AK, SXT	XDR	<i>bla</i> _{OXA} -23-like/ <i>bla</i> _{OXA} -51-like	Tn2006	113/79	H6	BU	2016	Death

SAM – Ampicillin-sulbactam; TZP – Piperacillin-tazobactam; CTX – Cefotaxime; CAZ – Ceftazidime; FEP – Cefepime; IPM – Imipenem; MEM– Meropenem; CIP – Ciprofloxacin; LEV – Levofloxacin; AK – Amikacin; CN – Gentamicin; SXT – Trimetoprim-sulfamethoxazole; CL – Colistin; PB – Polymyxin B; TE – Tetracycline; TGC – Tigecycline; CC – Clonal Complex; BU – Burn unit; ER – Emergency Room; ICU – Intensive care unit; MIC – Minimum inhibitory concentration; NA – Not applicable; ND – Not detected; XDR – Extensively resistant; MDR – Multidrug-resistant.

APÊNDICE C

Dendrogram constructed from the ERIC-PCR analysis of the *Acinetobacter baumannii* strains

5 CONCLUSÃO

- Embora, neste estudo, não tenham sido determinados os fatores de risco e calculada a mortalidade atribuída às infecções por *A. baumannii*, os dados clínicos obtidos no período avaliado sugerem que este foi um importante patógeno isolado de corrente sanguínea de pacientes internados no HU, principalmente daqueles com idade avançada, hospitalizados em UTI por período prolongado e com desfecho clínico que resultou em mortalidade na maioria dos casos.
- As altas taxas de não sensibilidade (isolados intermediários ou resistentes) às principais classes de antimicrobianos e o elevado número de isolados ER detectados refletem as dificuldades e o desafio enfrentado no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* no HU. Embora nenhum isolado PR tenha sido detectado neste estudo, os índices de resistência às polimixinas e à tigeciclina demonstram a necessidade da implantação de programas *stewardship* para o gerenciamento, controle e uso racional destes antimicrobianos a fim de preservar as taxas de sensibilidade a estas limitadas opções terapêuticas.
- As altas taxas de resistência aos carbapenêmicos bem como os elevados valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ obtidos para o imipenem e meropenem sugerem uma limitada efetividade destes fármacos como monoterapia ou possivelmente na forma de terapia combinada para o tratamento das infecções severas causadas por *A. baumannii* no HU.
- Apesar de outros mecanismos de resistência aos carbapenêmicos não terem sido avaliados neste estudo, o elevado número de isolados produtores de OXA-carbapenemases revela a importância da produção destas enzimas como um mecanismo que parece contribuir para a manutenção das altas taxas de resistência de *A. baumannii* aos beta-lactâmicos no HU, nos dez anos de estudo.

- A presença dos transposons Tn2006 e Tn2008 nos isolados carreadores do gene *bla*_{OXA-23} indicam a associação destes elementos ao fenótipo **CR** (**C**arbapenem **R**esistente) obtido para a maioria dos isolados investigados e sugerem a contribuição dos mesmos na disseminação e manutenção de diferentes clones de *A.baumannii* carreando este gene no HU.
- A presença do gene *bla*_{OXA-143} e das variantes *bla*_{OXA-231} e *bla*_{OXA-253} em isolados ER demonstram a emergência e manutenção de novos determinantes de resistência aos carbapenêmicos e demandam medidas de controle e prevenção de infecção efetivas a fim de conter a disseminação destes clones de *A. baumannii* e prevenir potenciais surtos de infecção de difícil tratamento no HU.
- Embora o número de isolados tenha sido limitado em alguns anos do período estudado, a análise de similaridade genética demonstrou policlonalidade dos isolados carreadores de genes de carbapenemases indicando provavelmente uma pressão seletiva devido ao uso extensivo de carbapenêmicos nestes últimos anos no HU. A presença de clones epidêmicos mundiais no HU, verificada na análise da ancestralidade, representa um achado preocupante que demonstra urgência na gestão clínica do uso de antimicrobianos e constância na vigilância epidemiológica neste hospital.
- A alta capacidade de formação de biofilme e a elevada frequência do gene *bap* observada entre os isolados representam fatores críticos que, possivelmente, estejam relacionados ao desenvolvimento de infecções por *A. baumannii*, dificuldades no tratamento dos pacientes e à permanência de cepas epidêmicas ambientais no HU.
- A combinação de importantes mecanismos de resistência e a expressiva capacidade de formação de biofilme dos isolados refletem o panorama dos desafios enfrentados pelo corpo clínico do HU no manejo das infecções por *A. baumannii*, e ressaltam a importância da contribuição de estudos microbiológicos dos padrões de resistência antimicrobiana bem como da

vigilância da emergência de novos mecanismos de resistência auxiliando, assim, na abordagem multifacetada do controle de infecções.