



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LARISSA DOS SANTOS FÁVARO

**ESTUDO DE DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS E DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter* spp**

Londrina
2019

LARISSA DOS SANTOS FÁVARO

**ESTUDO DE DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS E DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter* spp**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Floristher Elaine Carrara Marroni

Londrina
2019

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

Fávaro, Larissa dos Santos.

Estudo de Determinantes de Resistência aos Antimicrobianos e de Fatores de Virulência em Isolados Clínicos de *Acinetobacter* spp. / Larissa dos Santos Fávaro. - Londrina, 2019.
119 f. : il.

Orientador: Floristher Elaine Carrara Marroni.
(dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2019.
Inclui bibliografia.

1. *Acinetobacter* spp. - . 2. Carbapenemase - . 3. CHDL - . 4. Resistência aos Antimicrobianos - . I. Carrara Marroni, Floristher Elaine. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

LARISSA DOS SANTOS FÁVARO

**ESTUDO DE DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS E DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter* spp**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Floristher Elaine
Carrara Marroni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Suelen Balero de Paula Petrolí
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 07 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais, Ana e Donizete, à minhas irmãs, Caroline e Mariana, à minha tia Maria Inês, e à todos os familiares e amigos que sempre me apoiaram, incentivaram e não permitiram que eu desistisse nos momentos de dificuldade. Obrigada por todo o suporte, carinho e dedicação!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Floristher Elaine Carrara Marroni pela oportunidade, por acreditar em mim e na minha capacidade. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado, por todo o empenho, colaboração e orientação, não medindo esforços para que este trabalho fosse realizado.

À Prof^a. Dr^a. Suelen Balero de Paula Petrolí por aceitar o convite de participação na banca. Por todos os ensinamentos, pelo grande auxílio na realização de metodologias deste trabalho, bem como na redação dos artigos. Obrigada pelo carinho e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta e a Prof^a. Dr^a. Lucy Megumi Yamauchi Lioni por permitir a utilização dos equipamentos de seus laboratórios, e que em conjunto com a Mariangela Hungria e o Renan Augusto Ribeiro do Laboratório de Biotecnologia do Solo da EMBRAPA Soja tornaram possível a realização do sequenciamento do genoma total. Ao Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares pelo auxílio na análise do genoma, e a todos os alunos do Laboratório NIP-5 que de alguma forma me ajudaram.

Ao Prof. Dr. Emerson José Venancio por aceitar o convite de participação na banca. Por permitir a utilização dos equipamentos de seus laboratórios, e por participar de importantes etapas deste trabalho.

À Prof^a. Dra^a. Maria Cristina Bronharo Tognim e a Dr^a. Márcia Maria dos Anjos Szczerepa pelo auxílio na utilização do BioNumerics e geração dos dendogramas.

À Prof^a. Eiko Nakagawa Itano por disponibilizar seu laboratório para a realização da dosagem do DNA dos isolados utilizando o aparelho NanoDrop.

À Prof^a. Claudete de Fátima Ruas e aos seus alunos Lucas Benício e Sara Godoy pela realização das reações de sequenciamento das amostras.

Às minhas parceiras de laboratório, Ma. Priscila Romanin e Ma. Raquel de Lima Palermo por todo o conhecimento transmitido, por toda ajuda e paciência, e principalmente pela amizade.

Aos estagiários Jônatas Fernando Cavalini, Camila Felipe de Moura e Joyce Karoline Coimbra pela ajuda, parceria e bons momentos.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em

Fisiopatologia Clínica e Laboratorial por todo o aprendizado, e por colaborarem com o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Aos funcionários do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário e Hospital Universitário, sempre atenciosos e simpáticos.

À Fundação Araucária pela concessão da bolsa.

Aos meus pais, Donizete e Ana, exemplos de força e superação. Pai e mãe amorosos, dedicados, pessoas nas quais me inspiro e sinto muito orgulho em ter na minha vida. Se hoje sou o que sou e cheguei onde estou é graças a eles. Obrigada por sempre estarem ao meu lado me apoiando e dando suporte em todos os momentos da minha vida.

Às minhas irmãs, Caroline e Mariana, que além de irmãs, são minhas amigas e companheiras. Obrigada por todo apoio nesta caminhada.

À minha tia Maria Inês, minha mãe de coração, amiga e conselheira. Mesmo longe, sempre esteve presente, e nunca mediu esforços para ajudar eu e minhas irmãs.

À toda minha família por acreditarem em mim, quando eu não mais acreditava, e por todo o zelo e amor à mim dedicados. Vocês são o motivo de eu nunca desistir e seguir lutando.

À minha amiga e irmã de alma, Mariana Inocencio Manzano, que desde a graduação se faz presente em minha vida, me apoiando, aconselhando e incentivando, mesmo que à distância. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Obrigada a todos que fizeram parte desta etapa na minha vida!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

FÁVARO, Larissa dos Santos. **Estudo de determinantes de resistência aos antimicrobianos e de fatores de virulência em isolados clínicos de *Acinetobacter* spp.** 2019. 119 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar os determinantes de resistência aos antimicrobianos e fatores de virulência de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. recuperados de pacientes atendidos no Hospital Universitário (HU) de Londrina no período de janeiro de 2006 à março de 2018. **Artigo científico A:** Neste estudo foram caracterizados um total de 282 isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* recuperados de material respiratório de pacientes hospitalizados nas unidades de terapia intensiva (UTI) do HU entre os anos de 2006 e 2016. A identificação dos isolados foi realizada por métodos bioquímicos convencionais, sistemas automatizados e amplificação do gene *bla*_{OXA-51}. A maioria dos isolados foram considerados multirresistentes (MR) (76,3%) e altas taxas de resistência aos antimicrobianos foram verificadas, inclusive aos carbapenêmicos, fármacos de escolha para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* MR. A elevada taxa de resistência aos carbapenêmicos (100,0%) é atribuída à prevalência de isolados portadores do gene codificador da carbapenemase OXA-23 (93,6%), sendo o gene *bla*_{OXA-23}, em sua maioria, associado ao Tn2008 (92,8%), seguido pelo Tn2006. Além disso, a variante *bla*_{OXA-253} foi detectada em um isolado (0,4%). Um perfil policlonal foi observado entre os isolados, os quais pertenceram aos complexos clonais internacionais CC113/79, CC110/25 e CC103/15. Estes dados justificam a manutenção e disseminação do gene *bla*_{OXA-23} entre os isolados de *A. baumannii* nesta instituição. **Artigo científico B:** Neste estudo reportamos a descrição do primeiro isolado de *Acinetobacter bereziniae* carreador do gene *bla*_{OXA-58} detectado no Brasil. Pelo sequenciamento do genoma total do isolado Ac 374/14 verificou-se que este isolado, MR e forte produtor de biofilme, apresenta 13 genes de resistência aos antimicrobianos incluindo determinantes de resistência aos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, fencóis e sulfonamida. Em adição, este isolado apresenta diversos sistemas de efluxo e genes de virulência. Por meio das análises *in silico* o contexto genético do gene *bla*_{OXA-58} foi caracterizado, demonstrando que este gene está flanqueado em ambos os lados pela sequência de inserção IS_{Aba3}, com o IS_{Aba3} interrompido pela IS_{Aba125} à montante do gene *bla*_{OXA-58}. Este estudo revelou um novo determinante de resistência aos carbapenêmicos no HU, desta forma, é necessária a tomada de medidas de controle para impedir a disseminação deste gene. **Artigo científico C:** O objetivo deste estudo foi identificar a presença de genes codificadores de carbapenemases em espécies de *Acinetobacter* não-*baumannii* isoladas em um hospital brasileiro. Quatorze isolados de *Acinetobacter* spp. recuperados do HU entre 2006 e 2018 foram estudados. De acordo com a análise do sequenciamento do gene *rpoB*, foram identificados sete isolados de *Acinetobacter bereziniae*, dois de *A. haemolyticus*, dois de *A. ursingii*, e um de cada das espécies *A. radioresistens*, *A. colistiniresistens* e *Acinetobacter* sp. Seis isolados, cinco *A. bereziniae* e um *A. colistiniresistens*, carregaram o *bla*_{OXA-58} e foram considerados produtores de biofilme, e o isolado identificado como *A. radioresistens* apresentou o gene *bla*_{OXA-23}. A análise de ERIC-

PCR dos isolados carreadores de *bla*_{OXA-58} mostrou que três isolados de *A. bereziniae* foram clonalmente relacionados, dos quais dois foram idênticos, enquanto três isolados pertenceram a clusters individuais. Este estudo ressalta a necessidade da identificação correta de espécies de *Acinetobacter* e a implementação de medidas de controle de infecção hospitalar adequada para impedir a disseminação de determinantes de resistência, como o gene *bla*_{OXA-58}, entre outros patógenos hospitalares relevantes.

Palavras-chave: *Acinetobacter* spp. Carbapenemases. CHDL. Complexo clonal. Resistência aos antimicrobianos.

FÁVARO, Larissa dos Santos. **Study of determinants of antimicrobials resistance and virulence factors in clinical isolates of *Acinetobacter* spp.** 2019. 119p. Dissertation (Master's Degree in Clinical and Laboratory Physiopathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the determinants of antimicrobial resistance and virulence factors of clinical isolates of *Acinetobacter* spp. recovered from patients attended at the Hospital Universitário of Londrina (HU) from January 2006 to March 2018. **Scientific article A:** In this study, a total of 282 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates recovered of respiratory material of inpatients in the intensive care units (ICU) of the HU between the years 2006 and 2016 were characterized. Identification of the isolates was performed by conventional biochemical methods, automated systems and amplification of the *bla*_{OXA-51} gene. Most isolates were considered multidrug-resistant (MDR) (76.3%) and high antimicrobial resistance rates were verified, including carbapenems, drugs of choice for the treatment of infections caused by *A. baumannii* MDR. The high rate of resistance to carbapenems (100.0%) is attributed to the prevalence of the gene encoding the carbapenemase OXA-23 (93.6%), being the *bla*_{OXA-23-like} gene mostly associated with Tn2008 (92.8%), followed by Tn2006. In addition, the variant *bla*_{OXA-253} was detected in one isolate (0.4%). A polyclonal profile was observed among the isolates, which belonged to the international clonal complexes CC113/79, CC110/25 and CC103/15. These data justify the maintenance and dissemination of the *bla*_{OXA-23} gene among the isolates of *A. baumannii* in this institution. **Scientific article B:** In this study we report the description of the first isolate of *Acinetobacter bereziniae* carrying of the *bla*_{OXA-58} gene detected in Brazil. By sequencing the total genome of isolate Ac 374/14 was verified that this isolate, MDR and strong biofilm producer, presents 13 antimicrobial resistance genes including determinants of resistance to beta-lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones, phenicols and sulfonamide. In addition, this isolate presents several efflux systems and virulence genes. By means of *in silico* analyzes the genetic context of the *bla*_{OXA-58} gene was characterized, demonstrating that this gene is flanked on either sides by the IS*Aba*3 insertion sequence, with IS*Aba*3 interrupted by the IS*Aba*125 upstream of the *bla*_{OXA-58} gene. This study revealed a new determinant of resistance to carbapenems in HU, so it is necessary to take control measures to prevent the spread of this gene. **Scientific article C:** The aim of this study was to identify the presence of carbapenemases-encoding genes in non-*baumannii* *Acinetobacter* species isolated in a Brazilian hospital. Fourteen isolates of *Acinetobacter* spp. recovered of the HU between 2006 and 2018 were studied. According to the *rpoB* gene sequencing analysis, was identified seven isolates of *Acinetobacter bereziniae*, two of *A. haemolyticus*, two of *A. ursingii*, and one from each species *A. radioresistens*, *A. colistiniresistens* and *Acinetobacter* sp. Six isolates, five *A. bereziniae* and one *A. colistiniresistens*, harbored the *bla*_{OXA-58} and was considered biofilm producers, and the isolate identified as *A. radioresistens* presented the *bla*_{OXA-23} gene. ERIC-PCR analysis of *bla*_{OXA-58} harborer isolates showed that three isolates of *A. bereziniae* were clonally related, of which two were identical, whereas three isolates belonged to individual clusters. This study highlights the need for correct identification of *Acinetobacter*

species and the implementation of appropriate hospital infection control measures to prevent the spread of resistance determinants like the *bla*_{OXA-58} gene among other relevant hospital pathogens.

Keywords: *Acinetobacter* spp. Antimicrobial resistance. Carbapenemases. CHDL. Clonal complex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estrutura de seqüências de inserção | 52 |
| Figura 2 – Estrutura de (A) integron de classe 1 e (B) integron de classe 2 | 54 |
| Artigo B | |
| Figure 1 – Genetic context of the <i>bla</i> _{OXA-58} in <i>Acinetobacter bereziniae</i> Ac 374/14 | 83 |
| Artigo C | |
| Figure 1 – Dendrogram based on ERIC-PCR of <i>Acinetobacter bereziniae</i> and <i>Acinetobacter colistiniresistens</i> isolates harboring <i>bla</i> _{OXA-58} gene | 95 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Reservatórios de algumas espécies de <i>Acinetobacter</i> não- <i>baumannii</i> isoladas no ambiente hospitalar. | 28 |
| Tabela 2 – Espécies de <i>Acinetobacter</i> não- <i>baumannii</i> isoladas em humanos no ambiente hospitalar | 30 |
| Tabela 3 – Classes de antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções por <i>Acinetobacter</i> spp. | 35 |
| Tabela 4 – Variantes enzimáticas de beta-lactamases da classe D hidrolisadoras de carbapenêmicos..... | 43 |
| Artigo A | |
| Table 1 – Demographic and clinical characteristics of patients with infection caused by <i>Acinetobacter baumannii</i> isolated from tracheal aspirate..... | 72 |
| Table 2 – Antimicrobial susceptibility profile of <i>Acinetobacter baumannii</i> isolated from tracheal aspirate | 73 |
| Table 3 – Antimicrobial susceptibility profile and molecular characterization of <i>Acinetobacter baumannii</i> isolated from tracheal aspirate | 74 |
| Artigo C | |
| Table 1 – Demographic data of patients, clinical characteristics, identification and characterization of non- <i>baumannii</i> <i>Acinetobacter</i> isolates | 93 |
| Table 2 – Antimicrobial susceptibility profile, genetic similarity, genetic context and biofilm production of <i>Acinetobacter bereziniae</i> and <i>Acinetobacter colistiniresistens</i> isolates harboring <i>bla</i> _{OXA-58} gene | 94 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|--|
| AAC | <i>Aminoglycoside-Acetyltransferase</i> |
| AAD | <i>Aminoglycoside-Adenyltransferase</i> |
| Abc | <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> |
| ADC | <i>Acinetobacter-Derived Cephalosporinase</i> |
| AFLP | <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> |
| AHL | Acil Homoserina Lactona (Lactona de acil homoserina) |
| AME | <i>Aminoglycoside-Modifying Enzyme</i> |
| AmpC | Cefalosporinase cromossômica do tipo AmpC |
| ANT | <i>Aminoglycoside-Nucleotidyltransferase</i> |
| APH | <i>Aminoglycoside-Phosphotransferase</i> |
| ARI-1 | <i>Acinetobacter Resistant to Imipenem</i> |
| Arm | <i>Aminoglycoside Resistance Methylase</i> |
| Ata | <i>Acinetobacter Trimeric Autotransporter adhesin</i> |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| B | Beta |
| Bap | <i>Biofilm Associated Protein</i> (proteína associada ao biofilme) |
| Bla | Gene codificador de Beta-Lactamase |
| bp | <i>Base Pairs</i> (Pares de base) |
| CC | <i>Clonal Complex</i> (Complexo clonal) |
| CCIH | Comissão de Controle de Infecção Hospitalar |
| CFU | Colony Forming Unit (Unidade formadora de colônia) |
| CHDL | <i>Carbapenem-Hydrolyzing class D beta-Lactamases</i> |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| Cpa | <i>Collagen-binding Protein of group A</i> |
| CRAb | <i>Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii</i> |
| CS | <i>Conserved Segment</i> |
| CTX-M | <i>Cefotaxime Munich</i> |
| Dfr | <i>Dihydrofolate Reductase</i> |
| ECDC | <i>European Centre for Disease prevention and Control</i> |
| EDTA | <i>Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid</i> (Ácido etileno-diamino-tetracético) |

| | |
|-------------------|--|
| ER | Extensivamente Resistente aos antimicrobianos |
| ERIC-PCR | <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR</i> |
| ESAC | <i>Extended-Spectrum AmpC</i> |
| ESBL | <i>Extended-Spectrum Beta-Lactamases</i> |
| ES-OXA | <i>Extended-Spectrum Oxacillinases</i> |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| g | Gramma |
| GalN | <i>Galactosamine</i> (Galactosamina) |
| GES | <i>Guiana Extended Spectrum</i> |
| GIM | <i>German Imipenemase</i> |
| GLASS | <i>Global Antimicrobial Resistance Surveillance System</i> |
| GyrB | <i>DNA gyrase subunit B</i> (DNA girase subunidade B) |
| HU | Hospital Universitário de Londrina |
| ICU | <i>Intensive Care Unit</i> |
| IMP | <i>Imipenemase</i> |
| INICC | <i>International Nosocomial Infection Control Consortium</i> |
| Intl | <i>Class I Integrase</i> |
| IRAS | Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde |
| IS | <i>Insertion Sequence</i> (Sequência de inserção) |
| ISAb _a | <i>Insertion Sequence Acinetobacter baumannii</i> |
| ITU | Infecção do Trato Urinário |
| KPC | <i>Klebsiella pneumoniae Carbapenemase</i> |
| L | Litro |
| LEMRA | Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência aos Antimicrobianos |
| Lip | Lipase |
| LOS | Lipooligossacarídeos |
| LPS | Lipopolissacarídeos |
| Lpx | Lipoxigenase |
| MATE | <i>Multidrug And Toxic compound Extrusion</i> |
| MBL | Metalo-Beta-Lactamase |
| Mcr | <i>Plasmid-Mediated Colistin Resistance</i> |
| MDR | <i>Multidrug-Resistant</i> |

| | |
|--------|--|
| MFS | <i>Major Facilitator Superfamily</i> |
| MIC | <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> |
| mL | Mililitro |
| MR | Multirresistente aos antimicrobianos |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NDM | <i>New Delhi Metallo-beta-lactamase</i> |
| NHSN | <i>National Healthcare Safety Network</i> |
| NSBL | <i>Narrow-Spectrum Beta-Lactamases</i> |
| NS-OXA | <i>Narrow-Spectrum Oxacillinases</i> |
| OMP | <i>Outer Membrane Protein</i> (Porina de membrana externa) |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OMV | <i>Outer Membrane Vesicle</i> (Vesícula de membrana externa) |
| Opr | <i>Outer Protein</i> |
| OXA | Oxacilinase |
| PAH | Pneumonia Adquirida no Hospital |
| ParC | <i>DNA Topoisomerase IV subunit A</i> (DNA topoisomerase subunidade A) |
| PAV | Pneumonia Associada à Ventilação mecânica |
| PBP | <i>Penicillin Binding-Proteins</i> (Proteína ligadora de penicilina) |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase) |
| PDR | <i>Pandrug-Resistant</i> |
| PER | <i>Pseudomonas Extended Resistant</i> |
| Pmt | <i>Phosphoethanolamine Methyltransferase</i> |
| Qnr | <i>Quinolone Resistance</i> |
| PEtN | <i>Phosphoethanolamine</i> (Fosfoetanolamina) |
| PR | Pan Resistentes aos antimicrobianos |
| Qac | <i>Quaternary Ammonium Compound</i> |
| QEA | <i>Quantitative Endotracheal Aspirate</i> |
| RA | Resistência aos Antimicrobianos |
| RAST | <i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i> |
| RNAr | RNA ribossomal |
| RND | <i>Resistance-Nodulation-Division</i> |
| RpoB | <i>RNA Polymerase Subunit B</i> (RNA polimerase subunidade B) |
| Sat | <i>Streptothricin Acetyltransferase</i> |

| | |
|-------|--|
| SHV | <i>Sulphydryl-Variable beta-lactamase</i> |
| SIM | <i>Seoul Imipenemase</i> |
| SPM | <i>São Paulo Metallo-beta-lactamase</i> |
| SST1 | Sistemas de Secreção Tipo I |
| SST2 | Sistemas de Secreção Tipo II |
| SST4 | Sistemas de Secreção Tipo IV |
| SST5 | Sistemas de Secreção Tipo V |
| SST6 | Sistemas de Secreção Tipo VI |
| Sul | <i>Sulfonamide Resistance</i> |
| TEM | <i>Temoniera beta-lactamase</i> |
| Tn | Transposon |
| Tns | <i>Transposition</i> |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| UTI | Unidades de Terapia Intensiva |
| VEB | <i>Vietnam Extended-spectrum Beta-lactamase</i> |
| VIM | <i>Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase</i> |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |
| XDR | <i>Extensively Drug-Resistant</i> |
| 2-MPA | <i>2-Mercaptopropionic Acid (Ácido 2-mercaptopropiônico)</i> |
| µg | Micrograma |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 20 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA | 26 |
| 2.1 | CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>ACINETOBACTER</i> SPP. | 26 |
| 2.2 | RESERVATÓRIOS DE <i>ACINETOBACTER</i> SPP. | 27 |
| 2.3 | INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>ACINETOBACTER</i> SPP. | 28 |
| 2.4 | ESPÉCIES EMERGENTES DE <i>ACINETOBACTER</i> NÃO- <i>BAUMANNII</i> | 29 |
| 2.4.1 | <i>Acinetobacter bereziniae</i> | 29 |
| 2.4.2 | <i>Acinetobacter colistiniresistens</i> | 31 |
| 2.4.3 | <i>Acinetobacter haemolyticus</i> | 32 |
| 2.4.4 | <i>Acinetobacter radioresistens</i> | 33 |
| 2.4.5 | <i>Acinetobacter ursingii</i> | 33 |
| 2.5 | DEFINIÇÕES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM <i>ACINETOBACTER</i> SPP. | 34 |
| 2.6 | MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM <i>ACINETOBACTER</i> SPP. | 35 |
| 2.6.1 | Resistência aos Carbapenêmicos | 37 |
| 2.6.1.1 | Beta-lactamases | 37 |
| 2.6.1.1.1 | Classe A de Ambler | 38 |
| 2.6.1.1.2 | Classe B de Ambler | 40 |
| 2.6.1.1.3 | Classe C de Ambler | 40 |
| 2.6.1.1.4 | Classe D de Ambler | 41 |
| 2.6.2 | Resistência aos Aminoglicosídeos | 46 |
| 2.6.3 | Resistência às Quinolonas | 47 |
| 2.6.4 | Resistência às Tetraciclinas e Glicilglicinas | 48 |
| 2.6.5 | Resistência às Polimixinas | 48 |
| 2.6.6 | Elementos Genéticos Móveis | 51 |
| 2.6.6.1 | Sequências de inserção | 51 |
| 2.6.6.2 | Transposons | 52 |
| 2.6.6.3 | Integrans | 52 |
| 2.6.6.4 | Plasmídeos | 54 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.7 | DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA DE <i>ACINETOBACTER</i> SPP | 54 |
| 2.7.1 | Biofilme | 55 |
| 2.7.2 | Motilidade em <i>Acinetobacter</i> spp. | 56 |
| 2.7.3 | Polissacarídeos Capsulares e Lipooligossacarídeos | 56 |
| 2.7.4 | Sistemas de Aquisição de Metais..... | 57 |
| 2.7.5 | Sistemas de Secreção de Proteínas | 57 |
| 2.7.6 | Vesículas de Membrana Externa | 58 |
| 2.7.7 | Proteínas de Membrana Externa..... | 59 |
| 2.7.8 | <i>Quorum Sensing</i> | 59 |
| 3 | OBJETIVOS | 60 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 60 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 60 |
| 4 | ARTIGO A – Antimicrobial resistance and distribution of OXA-carbapenemases in <i>Acinetobacter baumannii</i> recovered of respiratory material in the period of ten years | 62 |
| 5 | ARTIGO B – First report of an <i>Acinetobacter bereziniae</i> isolate carrying the <i>bla</i>_{OXA-58} in Brazil | 75 |
| 6 | ARTIGO C – Occurrence of OXA-58 in non-<i>baumannii</i> <i>Acinetobacter</i> clinical isolates from Brazil | 84 |
| 7 | CONCLUSÃO GERAL | 96 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 98 |
| | APÊNDICES | 115 |
| | APÊNDICE A – Oligonucleotídeos utilizados para a caracterização molecular de isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. | 116 |

1 INTRODUÇÃO

Em 2014, foi publicado o documento *Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance* no qual pesquisadores relataram a situação da resistência aos antimicrobianos (RA) no mundo. Neste primeiro estudo, os dados indicaram altas taxas de RA, resultando na limitação no tratamento de infecções comunitárias (infecções urinárias e pneumonia), bem como de infecções graves associadas à instituições de cuidado à saúde. Diante das lacunas observadas na cobertura e magnitude desta ameaça global à saúde pública este documento ressaltou a necessidade de medidas colaborativas com a finalidade de estabelecer redes de vigilância internacionais da RA para o monitoramento da eficácia das intervenções de saúde pública e para a detecção de novas tendências e ameaças (WHO, 2014).

Segundo o documento *Tackling drug-resistant Infections globally: Final report and Recommendations*, publicado em 2016, estima-se que, caso o panorama atual seja mantido, em 2050 o número de mortes atribuídas à RA (10 milhões/ano ou 1 a cada 3 segundos) supere as mortes causadas pelo câncer e diabetes, por exemplo. Além de apresentar valores expressivos de mortes em todos os continentes, e um ônus econômico de até \$100 trilhões. Além disso, neste documento O'Neill destacou 10 atitudes a serem tomadas no enfrentamento da RA e estas atitudes incluíram a consciência pública para o uso correto dos antimicrobianos, bem como o uso destas substâncias na agricultura e no ambiente, atenção às medidas de saneamento e higiene, desenvolvimento de políticas públicas nacionais e internacionais que visem o financiamento e a formação de capital humano para o desenvolvimento de vacinas e alternativas, novos antimicrobianos, diagnóstico rápido e vigilância (O'NEILL, 2016).

Para atender a necessidade do monitoramento constante da RA no mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou o *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System* (GLASS), o primeiro esforço colaborativo global para padronizar a vigilância da RA quanto à coleta, análise e compartilhamento de dados por países. Em fase de implementação inicial (2015-2019), o GLASS coleta dados sobre bactérias como, *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus*

aureus e *Streptococcus pneumoniae* responsáveis por infecções em humanos, obtidas de diversos materiais clínicos, bem como avalia dados demográficos como, o número total de pacientes incluídos e variáveis como idade, sexo e origem da infecção a fim de definir onde a infecção foi contraída (hospital *versus* comunidade). No primeiro relatório parcial (2016-2017) foram incluídos 507.746 isolados provenientes de 40 países matriculados no GLASS até abril de 2017. Em dezembro de 2017, um total de 50 países, incluindo o Brasil, somavam esforços, países estes em diferentes estágios de desenvolvimento econômico (24 países de alta renda, nove de renda média-alta, 11 países de renda média-baixa e seis países de baixa renda) de todas as regiões do mundo (WHO, 2017).

Recentemente, a OMS divulgou as 10 prioridades de saúde para o ano de 2019, estas metas incluem o controle da RA, buscando implementar o plano de ação global de combate à resistência antimicrobiana, ressaltando a conscientização e o conhecimento sobre o tema, reduzindo infecções e incentivando o tratamento correto destas infecções, assim como fortalecer a atenção de saúde primária, estimular o uso de vacinas, diminuir a poluição ambiental e mudanças climáticas, reduzir cenários de fragilidade e vulnerabilidade, combater infecções transmissíveis como gripe, ebola, dengue e HIV, reduzir doenças crônicas não-transmissíveis como diabetes, câncer e doenças cardiovasculares (<https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>, último acesso: 23/01/2019).

Baseados em estudos de vigilância e dados da *Infectious Diseases Society of America*, pesquisadores começaram a se referir a um grupo de patógenos hospitalares como patógenos “ESKAPE”. Este termo é um acrônimo formado pelas iniciais das espécies bacterianas *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Estes microrganismos são os principais causadores de infecções hospitalares no mundo e apresentam mecanismos de resistência a múltiplas classes de antimicrobianos. Desta forma, são considerados importantes desafios na prática clínica uma vez que a limitação terapêutica está relacionada com infecções de alta morbidade e mortalidade (SANTAJIT; IDRAWATTANA, 2016).

Nos últimos anos, a incidência de infecções hospitalares causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos aumentou consideravelmente

no mundo, e o *A. baumannii* tem emergido como um importante patógeno multirresistente (MR) responsável por infecções, principalmente, em pacientes imunocomprometidos, com incidência mais elevada em unidades de terapia intensiva (UTI) (VALA et al. 2014; VIEIRA; PICOLI, 2015; LEE et al., 2017; SILVA et al., 2018). Embora esta seja a espécie do gênero *Acinetobacter* mais comumente isolada no ambiente hospitalar, as espécies *não-baumannii* também apresentam relevância clínica, no entanto, ainda pouco reconhecida devido à dificuldade do emprego de técnicas moleculares para identificação destes isolados na rotina laboratorial (AL ATROUNI et al., 2016).

Com base nos dados publicados pelo Programa SENTRY de vigilância de resistência aos antimicrobianos (*SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*) o *A. baumannii* configura o sétimo patógeno mais frequentemente recuperado em UTI (SADER et al., 2014). Recentemente, ao avaliar dados de 27 UTI em 9 países europeus, observou-se que o número de isolados de *A. baumannii* foi inferior apenas à enterobactérias, *S. aureus* e *P. aeruginosa* (LUYT et al., 2018). Nestas unidades hospitalares, os procedimentos invasivos são frequentes, incluindo o uso de ventiladores mecânicos e traqueostomia, os quais são fatores de risco para o desenvolvimento de pneumonias. O uso de tubo orotraqueal tem sido considerado um fator de risco para pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) uma vez que apresentam um nicho biológico ideal para a adesão bacteriana, possibilitando a formação de biofilme tanto no lúmen quanto na superfície do tubo (LI et al., 2015).

Em 2015, um estudo de prevalência pontual foi realizado utilizando dados do *Emerging Infections Program* de 10 estados dos Estados Unidos (EUA), no qual 4.614 pacientes atendidos nos 199 hospitais pesquisados atenderam aos critérios da pesquisa. Estes dados foram comparados com um estudo realizado em 2011 que avaliou 4.504 pacientes atendidos em 183 hospitais. Foi observado que 10,0% (2011) e 8,5% (2015) dos pacientes foram acometidos por infecções relacionadas à assistência de saúde (IRAS), sendo a pneumonia a infecção mais prevalente. Na comparação de casos de pneumonia de 2011 e 2015, foi verificado à ocorrência de 39,1% e 35,5% casos de PAV, respectivamente (MAGILL et al., 2018).

Weiner e colaboradores, ao avaliar IRAS reportadas ao *National Healthcare Safety Network* (NHSN) por 4515 hospitais entre 2011 e 2014, observaram à ocorrência de 365.490 casos de IRAS, dos quais foram identificados

408.151 patógenos. Destes, PAV correspondeu à 2,2% dos casos, que acometeu principalmente pacientes em UTI (94,8%) (WEINER et al., 2016). Há relatos de que a incidência de pneumonia em pacientes hospitalizados nas UTI seja de aproximadamente 25% com taxas de mortalidade entre 22 e 71%, com risco de adquirir pneumonia nesse ambiente de até 21 vezes maior em pacientes entubados (JOSEPH et al., 2009; JAIN et al., 2019). Gupta e colaboradores. (2017), ao estudar casos de pneumonias em UTI, reportaram *A. baumannii* como o segundo patógeno mais frequente, entretanto, ao avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados, esta espécie apresentou o maior número de isolados MR. Embora *A. baumannii* tenha sido o décimo segundo patógeno mais prevalente detectado em um estudo multicêntrico que avaliou dados de 358 hospitais americanos durante o ano de 2017, ao se avaliar o perfil de resistência destes isolados, foi classificado como o patógeno mais prevalente em relação aos isolados não sensíveis aos carbapenêmicos, tanto em UTI quanto em outras unidades hospitalares (McCANN et al. 2018).

Um estudo de vigilância multicêntrico do *International Nosocomial Infection Control Consortium* (INICC), incluiu dados de 503 UTI de 43 países entre os anos de 2007 e 2012, e reportou que dos 605.310 pacientes atendidos no período 2,9% desenvolveram PAV, com uma incidência de 14,7 casos por 1.000 dias de ventilação mecânica, e dentre os quais 77,1% dos isolados de *A. baumannii* recuperados apresentaram resistência aos carbapenêmicos (ROSENTHAL et al., 2014). Outro estudo recente, realizado em 703 UTI de 50 países no período de 2010 à 2015, reportou que dos 861.284 pacientes atendidos 5,8% foram acometidos por PAV, apresentando uma incidência de 12,2 casos por 1000 dias de ventilação, e 90,1% dos isolados de *A. baumannii* eram resistentes aos carbapenêmicos (ROSENTHAL et al., 2016).

Por meio de uma revisão sistemática de surtos hospitalares causados por *A. baumannii* entre os anos de 2000 e 2015, que incluiu 122 artigos de 22 países diferentes, observou-se a ocorrência de 150 surtos por *A. baumannii*, dos quais 113 (75,3%) foram causados por isolados MR. Os surtos foram notificados principalmente em UTI (69,3%), após o uso de antibióticos, durante ventilação mecânica, e apresentaram uma taxa de mortalidade de 47,1%, a qual não foi dependente do perfil de resistência do isolado (48,0% para isolados MR e 42,5%

para não-MR). Além disso, pneumonia (76,8%) foi umas das IRAS mais prevalentes associadas à *Acinetobacter* (WIELAND; CHHATWAL; VONBERG, 2018).

Segundo Djordjevic e colaboradores (2017), num estudo para estabelecer a prevalência de patógenos bacterianos em pacientes com pneumonia em UTI em um hospital na Sérvia no período de 2009 a 2015, dos 620 pacientes admitidos no estudo, 38,2% foram acometidos por pneumonia adquirida no hospital (PAH) e 61,8% por PAV, sendo a maioria destes infectados por um único patógeno (56,9%). O principal patógeno isolado durante o período avaliado foi *A. baumannii* (38,9%), dos quais 82,0% (PAH) e 85,3% (PAV) dos isolados foram resistentes aos carbapenêmicos, sendo a maioria classificados como MR (91,6% para PAH e 94,2% para PAV).

Os carbapenêmicos são beta-lactâmicos, considerados fármacos de escolha na terapia de infecções causadas por *Acinetobacter* MR (TIAN et al., 2018; ASIF; ALVI; REHMAN, 2018). Em *Acinetobacter* spp., a produção de carbapenemases é considerada o principal mecanismo que confere resistência aos carbapenêmicos (ROYER et al., 2018). Nos últimos anos, a disseminação de isolados portadores de genes codificadores de carbapenemases tem comprometido a eficácia destes antimicrobianos, resultando no aumento de *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAb), que em conjunto com a habilidade deste microrganismo em adquirir determinantes de resistência culminou no aumento de isolados MR. O aumento da resistência mundial aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp. é alarmante, pois limita as opções terapêuticas disponíveis. Frente a este panorama, em 2017, em um relatório publicado pela OMS, CRAb foi classificado como uma ameaça a saúde pública e um patógeno de prioridade crítica global para a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos (VIEIRA, PICOLI, 2015; LEE et al., 2017; ASIF; ALVI; REHMAN, 2018; SILVA et al., 2018; JEAN et al., 2018; WHO, 2017).

O monitoramento da resistência aos antimicrobianos em isolados de *Acinetobacter* spp. não sensíveis aos carbapenêmicos e ceftazidima vem sendo realizado no Hospital Universitário de Londrina (HU) desde 2006 pelo Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência aos Antimicrobianos (LEMRA). Num primeiro estudo foram avaliados 91 isolados recuperados entre 2006 e 2009 dos quais 61,2% apresentaram o gene *bla*_{OXA-23} e um isolado apresentou uma nova variante do gene

*bla*_{OXA-143} caracterizada como *bla*_{OXA-231} (GIONCO, 2012). Outro estudo, recentemente realizado por Romanin (2018), descreveu altas taxas de resistência aos carbapenêmicos e prevalência de isolados produtores de carbapenemases (92,2%) em isolados de *A. baumannii* recuperados de hemocultura. Além disso, a presença do gene *bla*_{OXA-23} foi detectada em 97,9% dos isolados e o *bla*_{OXA-253} em 2 isolados. O contexto genético e a presença de complexos clonais também foram avaliados e revelou que o gene *bla*_{OXA-23} estava associado predominantemente ao *Tn2006* e a maioria destes isolados pertenceram à complexos clonais epidêmicos, incluindo os clones de alto risco CC113/79 e CC103/15.

Em um estudo realizado no HU no período de 2009 à 2011 foi observado que a pneumonia (54,3%) foi a infecção mais frequente dentre as IRAS e nestes casos a maioria dos pacientes estavam em uso de ventilação mecânica (56,5%). Este estudo também evidenciou que a mortalidade dos pacientes com pneumonia foi 3,5 vezes maior em relação às demais infecções (sistema cardiovascular, sítio cirúrgico e trato urinário). Além disso, o *A. baumannii* (18,5%) foi o segundo patógeno mais frequente nos pacientes com IRAS que evoluíram a óbito (SOUZA et al., 2015).

Baseado nas recomendações mundiais a respeito da vigilância da RA, diante do problema evidenciado pelas altas taxas de casos de pneumonia no HU e sabendo da importância clínica de *Acinetobacter* spp. nestas infecções, bem como a limitação terapêutica que este patógeno apresenta na instituição devido RA, este estudo visa caracterizar isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. quanto ao perfil de sensibilidade, a presença de determinantes de resistência e de clones internacionais relacionados com a disseminação de genes codificadores de resistência aos antimicrobianos. Com isso, pretende-se fornecer dados à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do HU que possibilitem a implementação de medidas de prevenção e controle de infecções hospitalares por *Acinetobacter* spp., bem como direcionar a escolha de terapias antimicrobianas efetivas baseada no perfil de sensibilidade deste patógeno na instituição.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *ACINETOBACTER* SPP.

O gênero *Acinetobacter*, pertencente à família Moraxellaceae, teve o primeiro membro descrito em 1911 pelo microbiologista holandês Beijerinck. Esse microrganismo foi isolado do solo e foi originalmente nomeado *Micrococcus calcoaceticus* (BEIJERINCK, 1911 *apud* BÉRÉZIN; FRIEDMAN; BENDINELLI, 2008). Durante décadas, espécies semelhantes, como *Bacterium anitratum*, *Moraxella glucidolytica*, *Moraxella calcoacetica*, *Alcaligenes haemolysans*, *Herellea vaginicola*, *Achromobacter anitratum*, *Mima polymorpha*, *Achromobacter metalcaligenes*, *Achromobacter citrocaligenes* e *Moraxella lwoffii*, foram erroneamente classificadas como pertencentes a diferentes gêneros. Em 1953, Brisou propôs a inclusão destas espécies no gênero *Achromobacter*, e em 1954, Brisou e Prévot propuseram o gênero *Acinetobacter* para diferenciar as espécies Gram-negativas imóveis e que não produziam pigmentação dentro do gênero *Achromobacter* (HENRIKSEN, 1973; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; ALMASAUDI, 2018). No final dos anos 1960, Baumann e colaboradores (1968) desenvolveram um estudo comparando as propriedades nutricionais e bioquímicas de cepas designadas *Moraxellas* oxidase-negativas, no qual concluíram que todos os microrganismos mencionados acima pertenciam ao mesmo gênero, *Acinetobacter*. Estes dados resultaram no reconhecimento oficial do gênero *Acinetobacter* em 1971 pelo *Sub Committee on the Taxonomy of Moraxella and Allied Bacteria* e em 1974 pelo *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (LESSEL, 1971; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; HOWARD et al., 2012).

O gênero *Acinetobacter* é constituído por microrganismos Gram-negativos, que se apresentam sob a forma de cocobacilos Gram-negativos, geralmente aos pares, na fase exponencial de crescimento, e normalmente menores e quase esféricos na fase estacionária. São microrganismos não fermentadores da glicose, estritamente aeróbicos, oxidase-negativos, catalase-positivos, indol-negativos, citrato-positivos, imóveis, capazes de crescer em meio mineral com acetato como única fonte de carbono e amônia como única fonte de nitrogênio (BAUMANN; DOUDOROFF; STAINIER, 1968; ALMASAUDI, 2018).

Atualmente, o gênero *Acinetobacter* é composto por 60 espécies nomeadas (<http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>, último acesso: 31/01/2019), as quais foram caracterizadas e identificadas por meio do emprego de técnicas moleculares, como a hibridação DNA-DNA, sequenciamento dos genes codificadores do 16S rRNA, subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*), subunidade beta da DNA girase (*gyrB*), e mais recentemente o sequenciamento genômico completo (AL ATROUNI et al., 2016; LEE et al., 2017).

Embora a maioria das espécies de *Acinetobacter* seja ambiental e apresente baixa patogenicidade, dentre as espécies clinicamente relevantes destaca-se o *A. baumannii* por ser responsável por uma ampla gama de infecções hospitalares e adquiridas na comunidade como infecções respiratórias e do trato urinário. Além disso, isolados desta espécie apresentam altas taxas de resistência aos antimicrobianos e estão associados a infecções com mau prognóstico e consequente alta mortalidade. O *A. baumannii* pertence ao complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (Abc) juntamente com outras cinco espécies estritamente relacionadas: *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. seifertii*, *A. dijkshoorniae* e *A. calcoaceticus*, as quais são difíceis de serem distinguidas por meio de métodos bioquímicos convencionais utilizados na rotina laboratorial. Desta forma, é necessário o emprego de metodologias moleculares como a amplificação e sequenciamento do gene *rpoB* para a identificação em nível de espécie (ECDC, 2015; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; TURTON et al., 2010; LEE et al., 2017; LIN; LAN, 2014; TAKIZAWA et al., 2016).

2.2 RESERVATÓRIOS DE *ACINETOBACTER* SPP.

Como visto na Tabela 1, as espécies de *Acinetobacter* são ubíquas, podendo ser encontradas em diferentes nichos ecológicos, como água, solo, esgoto, lodo ativado, alimentos, animais, seres humanos, incluindo ambientes hospitalares (AL ATROUNI et al., 2016; CRAY et al., 2013; ALMASAUDI, 2018; ADEWOYIN; OKOH, 2018).

Tabela 1. Reservatórios de algumas espécies de *Acinetobacter* não-*baumannii* isoladas no ambiente hospitalar.

| Espécies | Reservatório |
|-------------------------------------|--|
| <i>A. baylyi</i> | Água, humano, lodo ativado e solo |
| <i>A. bereziniae</i> | Alimentos, animais, esgoto, humano, solo e superfícies ambientais |
| <i>A. calcoaceticus</i> | Água, alimentos, animais, esgoto, humano e solo |
| <i>A. colistiniresistens</i> | Humano |
| <i>A. grimontii</i> | Água, humano e lodo ativado |
| <i>A. haemolyticus</i> | Água, humano e solo |
| <i>A. johnsonii</i> | Água, alimentos, animais, esgoto, humano, lodo ativado e solo |
| <i>A. junii</i> | Animais, esgoto, humano, lodo ativado e solo |
| <i>A. lwoffii</i> | Água, animais, alimentos, esgoto, frutos do mar, humano, lodo ativado, solo e superfícies ambientais |
| <i>A. nosocomialis</i> | Alimentos, esgoto, humano, solo e superfícies ambientais |
| <i>A. parvus</i> | Alimentos, animais, humano e solo |
| <i>A. pittii</i> | Água, alimentos, animais, esgoto, humano, solo e superfícies ambientais |
| <i>A. radioresistens</i> | Alimentos, animais, humano e solo |
| <i>A. seifertii</i> | Alimentos, humano e superfícies ambientais |
| <i>A. ursingii</i> | Alimentos e humano |

Fonte: adaptado de AL ATROUNI et al., 2016; ADEWOYIN; OKOH, 2018; <http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>, último acesso: 01/02/2019.

2.3 INFECÇÕES CAUSADAS POR *ACINETOBACTER* SPP.

Acinetobacter spp. é um dos principais patógenos causadores de IRAS no mundo. Estão associados a diversos tipos de infecções, incluindo PAV, meningite, bacteremia, infecções de feridas e infecções do trato urinário (ITU) (ECDC, 2015; LEE et al., 2017; ALMASAUDI, 2018). Os principais fatores de risco relacionados à colonização ou infecção por *Acinetobacter* spp. incluem: idade avançada, neonatos com baixo peso, realização de procedimentos invasivos, hospitalização prolongada, comorbidades, imunossupressão, uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro (WENZLER et al., 2017; ELHOSSEINY; ATTIA, 2018; ASIF; ALVI; REHMAN, 2018; ALMASAUDI, 2018).

Parte do sucesso de *Acinetobacter* spp. no ambiente hospitalar pode ser diretamente atribuído à sua plasticidade genômica, a qual permite rápida adaptação ao ser submetido a condições adversas e estresse; o potencial de adquirir múltiplos determinantes de resistência; a capacidade de resistir à dessecação; bem como resistência aos antimicrobianos e a presença de fatores de

virulência (HARDING et al., 2013; FULSUNDAR et al., 2014; SILVA; DOMINGUES, 2016; ALMASAUDI, 2018; GARCIA et al., 2018). No entanto, as infecções causadas por esses patógenos não se restringem ao ambiente hospitalar, sendo cada vez mais frequente o relato de infecções adquiridas na comunidade, como pneumonia, cujos fatores de risco incluem a localização geográfica e patologias subjacentes, como diabetes mellitus, doença pulmonar obstrutiva crônica, tabagismo e etilismo (DEXTER et al., 2015; ELHOSSEINY; ATTIA, 2018).

2.4 ESPÉCIES EMERGENTES DE *ACINETOBACTER* NÃO-*BAUMANNII*

Embora o *A. baumannii* seja a espécie mais comumente isolada no ambiente hospitalar, o emprego de técnicas moleculares na identificação dos isolados tem aumentado a importância clínica de espécies de *Acinetobacter* não-*baumannii*, que incluem *A. baylyi*, *A. junii*, *A. ursingii*, *A. haemolyticus*, *A. Iwoffii*, *A. parvus* e *A. bereziniae*. Espécies não-*baumannii* têm sido responsáveis por infecções hospitalares graves, como PAV, bacteremia e ITU, apresentando frequentemente altos níveis de resistência aos antimicrobianos e codificando importantes determinantes de resistência (Tabela 2). Dentre os isolados não-*baumannii* detectados no HU estão as espécies *A. bereziniae*, *A. colistiniresistens*, *A. haemolyticus*, *A. radioresistens* e *A. ursingii* (TURTON et al., 2010; TOUCHON et al., 2014; AL ATROUNI et al., 2016; LEE et al., 2015; TAKIZAWA et al., 2016; EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018).

2.4.1 *Acinetobacter bereziniae*

Com a descrição de novas espécies de *Acinetobacter*, foi levantada a questão da importância destes microrganismos como potenciais agentes de infecções humanas. Dentre estas, o *Acinetobacter bereziniae*, espécie recém-nomeada e pouco citada na literatura, tem sido responsável por infecções humanas e tem sido considerada reservatório de genes codificadores de resistência a diversas classes de antimicrobianos, até mesmo aos carbapenêmicos (AL ATROUNI et al., 2016; KUO et al., 2010; SUNG et al., 2014).

Tabela 2. Espécies de *Acinetobacter* não-*baumannii* isoladas em humanos no ambiente hospitalar.

| Espécies | Fonte humana | Referências |
|------------------------------|---|---|
| <i>A. baylyi</i> | Sangue, secreção de ferida, úlcera de córnea | CHEN et al., 2011; ZHOU et al., 2011; LEE et al., 2009; KIM et al., 2013; TURTON et al., 2010 |
| <i>A. beijerinckii</i> | Coração ^a , líquido de diálise peritoneal, material respiratório, vesícula, swab de garganta | TURTON et al., 2010; NEMEC et al., 2009 |
| <i>A. bereziniae</i> | Ferida, material respiratório ^b , sangue, urina | TURTON et al., 2010 |
| <i>A. calcoaceticus</i> | Ferida, material respiratório ^b , queimadura, sangue | LEE et al., 2009, TURTON et al., 2010; NEMEC et al., 2015; ZARRILI et al., 2018 |
| <i>A. colistiniresistens</i> | Abcesso, cateter, ferida, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, sangue | ZARRILI et al., 2018; NEMEC et al., 2017; LEE et al., 2014; TAKIZAWA et al., 2016 |
| <i>A. courvalinii</i> | Ferida, material respiratório, sangue | NEMEC et al., 2016 |
| <i>A. djkshoorniae</i> | Urina | ORTH et al., 2017 |
| <i>A. dispersus</i> | Ferida, úlcera | NEMEC et al., 2016 |
| <i>A. guillouiae</i> | Ferida, material respiratório, sangue, urina | NEMEC et al., 2010 |
| <i>A. gyllenbergii</i> | Material respiratório, sangue, swab de garganta, swab vaginal, urina | NEMEC et al., 2009 |
| <i>A. haemolyticus</i> | Líquido cefalorraquidiano, material respiratório ^b , sangue | TURTON et al., 2010; ZARRILI et al., 2018 |
| <i>A. indicus</i> | Swab | BONNIN et al., 2014 |
| <i>A. johnsonii</i> | Abcesso, coração ^a , sangue, urina | TURTON et al., 2010; MONTAÑA et al., 2016 |
| <i>A. junii</i> | Material respiratório ^b , sangue | TURTON et al., 2010; ZARRILI et al., 2018 |
| <i>A. lwoffii</i> | Abcesso, cateter, ferida, líquido cefalorraquidiano, material respiratório ^b , queimadura, sangue, urina | TURTON et al., 2010; ZARRILI et al., 2018; NEMEC et al., 2018; BROEK et al., 2009 |
| <i>A. modestus</i> | Sangue, urina | NEMEC et al., 2016 |
| <i>A. nosocomialis</i> | Material respiratório, material respiratório ^b , queimadura, sangue, urina | ZARRILI et al., 2018; NEMEC et al., 2011 |
| <i>A. parvus</i> | Sangue | TURTON et al., 2010; NEMEC et al., 2003 |
| <i>A. pittii</i> | Ferida, líquido, cefalorraquidiano, queimadura, sangue, urina | TURTON et al., 2010; NEMEC et al., 2011 |
| <i>A. proteolyticus</i> | Ferida, sangue | NEMEC et al., 2016 |
| <i>A. radioresistens</i> | Material respiratório ^b , sangue, urina | SAVOV et al., 2016; BRADY; LEWIS; PFEIFFER, 2016 |
| <i>A. schindleri</i> | Líquido pleural, urina | NEMEC et al., 2001 |
| <i>A. seifertii</i> | Material respiratório, sangue, úlcera | NEMEC et al., 2015 |
| <i>A. soli</i> | Material respiratório ^b , sangue | ZARRILI et al., 2018 |
| <i>A. ursingii</i> | Abcesso, ferida, olho, material respiratório ^b , sangue | TURTON et al., 2010; NEMEC et al., 2001 |
| <i>A. variabilis</i> | Ferida, material respiratório ^b , sangue, urina | TURTON et al., 2010; ZARRILI et al., 2018; KRIZOVA et al., 2015 |
| <i>A. vivianii</i> | Ferida, sangue | NEMEC et al., 2016 |

^a, Endocardite; ^b, Pneumonia.

Fonte: Dados do estudo

A espécie *Acinetobacter bereziniae* foi inicialmente descrita por Bouvet e Grimont (1986) como *Acinetobacter* genomospecie 10, com base em estudos de hibridação DNA-DNA e análises fenotípicas. Em 2010, baseado na congruência dos resultados da análise polifásica de 16 isolados pertencentes a esta espécie genômica, Nemeç e colaboradores propuseram o nome *A. bereziniae*. Nesse estudo foi observada a capacidade das cepas em oxidar glicose e crescer a 38°C, características que podem ser utilizadas para a diferenciação fenotípica desta espécie. Os isolados utilizados foram recuperados de várias fontes, sendo elas humanas (escarro, urina, sangue, ferida), animais (coelho, foca) e ambientais (ambiente hospitalar, esgoto) (NEMEC et al, 2010).

Há relatos na literatura de resistência aos antimicrobianos nesta espécie, incluindo aos carbapenêmicos, estando associada à presença de genes que codificam metalo-beta-lactamases (MBLs) do tipo IMP-1, IMP-5, IMP-19, NDM-1, VIM-2 e SIM-1, e *Carbapenem-hydrolyzing Class D β -lactamases* (CHDLs) do tipo OXA-58 e hiperexpressão da enzima intrínseca OXA-228-like (variantes OXA-229 e OXA-257 por meio de mutação no promotor e da presença da IS18 à montante do gene, respectivamente). Além destes determinantes, foram detectados outros genes codificadores de resistência aos beta-lactâmicos (*ampC*, *bla_{OXA-2}*, *bla_{OXA-4}*, *bla_{OXA-21}*), aminoglicosídeos (*aac6*, *aacA4*, *aadA1*, *aadB*, *aphA6*, *strA*, *strB*), cloranfenicol (*catB8*) e tetraciclina (*tetA*). No Brasil, nesta espécie foram identificados os genes codificadores das metalo-beta-lactamases IMP-1 e NDM-1 (YAMAMOTO et al., 2013; BROVEDAN et al., 2016; BONNIN et al., 2012; ZANDER et al., 2014; GROSSO et al., 2015; LEE et al., 2010; SUNG et al., 2014; CHAGAS et al., 2015).

2.4.2 *Acinetobacter colistiniresistens*

A espécie *Acinetobacter colistiniresistens* foi inicialmente descrita por Bouvet e Jeanjean (1989) como *Acinetobacter* genomospecie13BJ e por Tjernberg e Ursing (1989) como *Acinetobacter* genomospecie14TU, utilizando a hibridação DNA-DNA. Como estes dois grupos apresentavam uma cepa em comum, ATCC 17905, foi adotado o termo genomospecie 13BJ/14TU. Em 2017, baseado na congruência dos resultados da análise polifásica de 24 isolados pertencentes a esta espécie genômica, Nemeç e colaboradores propuseram o nome *A. colistiniresistens*.

Nesse estudo foi observada a forte atividade hemolítica e proteolítica desta espécie, que permite a diferenciação de outras espécies. Verificou-se também a capacidade de oxidar glicose e crescer em fenilacetato e/ou l-fenilalanina. Os isolados foram obtidos de fontes humanas, como cateter, ferida, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, olho, pele, pus, sangue e vagina (NEMEC et al., 2017).

Estudos anteriores sugeriram que os isolados pertencentes a esta espécie apresentavam resistência intrínseca à colistina, característica não observada em outras espécies, sendo de grande importância clínica devido reintrodução da colistina no tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* MR. No estudo realizado por Nemeç e colaboradores (2017) verificou-se que os isolados utilizados apresentaram valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 16-64 mg/L para colistina e 4-32 mg/L para polimixina B, enquanto espécies clinicamente mais relevantes apresentaram CIM inferior a 2 mg/L. Assim, dado o fenótipo de resistência às polimixinas sem a utilização prévia de terapia com estes antimicrobianos, sugeriu-se que esta característica seja em decorrência de uma propriedade intrínseca desta espécie, por isso o nome *A. colistiniresistens* (NEMEC et al., 2017). Os relatos desta espécie na literatura são escassos e os genes codificadores de carbapenemase do tipo CHDL detectados foram *bla_{OXA-23}* e *bla_{OXA-286}* e também da MBL *bla_{IMP-34}*. Até o presente momento não há relatos desta espécie no Brasil (ZANDER et al, 2014a; TIAN et al., 2018; SUZUKI et al., 2018- ainda não publicado).

2.4.3 *Acinetobacter haemolyticus*

A espécie *Acinetobacter haemolyticus*, também conhecida como genospecie 4, foi inicialmente descrita por Stenzel e Mannheim (1962) como *Achromobacter haemolyticus*. Em 1963, Bouvet e Grimont a partir do estudo de 23 isolados utilizando hibridização DNA-DNA e métodos fenotípicos propuseram o nome *A. haemolyticus*. Nesse estudo foi observada a capacidade hemolítica e proteolítica dos isolados, bem como o potencial de utilizar DL-4-aminobutirato, mas não DL-lactato. Os isolados foram recuperados de fontes humanas e ambientais.

Na literatura foi descrita a presença deste patógeno como agente causador de endocardites, bem como diarreia sanguinolenta mediada pela produção

de toxina Shiga. Além disso, foram detectados determinantes de resistência aos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, que incluem *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-40}, *aac*(6')-I_g e *armA* (STENZEL; MANNHEIM, 1963; FIGUEIREDO et al., 2012; LAMBERT et al., 1993; QUINTEIRA et al., 2007; CHATTERJEE et al., 2016).

2.4.4 *Acinetobacter radioresistens*

A espécie *Acinetobacter radioresistens* foi proposta por Nishimura, Ino e Iizuka em 1988 para isolados resistentes à radiação recuperados de amostras de algodão e solo, baseado em hibridização DNA-DNA e análises fenotípicas. Nesse estudo foi observada à alta resistência a irradiação de raios gama destes isolados, bem como a capacidade de crescer à 42°C, utilizar malonato e L-leucina. Considerada uma das espécies de *Acinetobacter* mais comuns no ambiente hospitalar, é intrínseca portadora do gene *bla*_{OXA-23-like}, que é expresso em baixos níveis. Fonte da carbapenemase adquirida mais disseminada e clinicamente relevante em *A. baumannii*, acredita-se que a troca genética entre as espécies possa ter ocorrido em humanos, levando em conta o fato de que ambos os patógenos são identificados na pele humana, especialmente em pacientes hospitalizados (POIREL et al., 2008).

Embora frequente na microbiota humana (pele), há relatos deste patógeno na literatura causando infecções como bacteremia e pneumonia. Apesar de apresentar a *bla*_{OXA-23-like} intrínseca, a resistência aos carbapenêmicos raramente é descrita na espécie e foi relatada apenas na presença dos genes codificadores de carbapenemases *bla*_{OXA-58}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{GIM-1} (VISCA et al., 2001; SAVOV et al., 2016; MENDES et al., 2009; HIGGINS; ZANDER; SEIFERT, 2012; HERRMANN et al., 2014).

2.4.5 *Acinetobacter ursingii*

A espécie *Acinetobacter ursingii*, também conhecida como phenon 1, foi descrita por Nemec e colaboradores em 2001 a partir do estudo de 29 isolados utilizando hibridação DNA-DNA, análise de polimorfismo por *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e métodos fenotípicos. Nesse estudo foi observado o

crescimento a 37°C, além da utilização de glutarato, L-aspartato e 4-hidroxibenzoato. Os isolados foram recuperados de fontes humanas, incluindo sangue, pus, ferida, entre outros (NEMEC et al., 2001).

Dados clínicos e epidemiológicos ressaltaram o potencial deste patógeno em causar infecções de corrente sanguínea, especialmente em pacientes imunocomprometidos e com comorbidades graves, no entanto, há relatos de infecções em pacientes imunocompetentes. Foi descrito nesta espécie genes codificadores de resistência aos beta-lactâmicos que incluem *bla*_{OXA-58}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{TEM-116}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{VEB-1}; e aos aminoglicosídeos como *aac*_{6-II} e *aadA4* (NEMEC et al., 2001; DUCASSE et al., 2008; ENDO et al., 2012; CHIU et al., 2015; YAKUT et al., 2016; PALKOVA; MINARIK, SOLTYS, 2018; FACCONI et al., 2019).

2.5 DEFINIÇÕES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *ACINETOBACTER* SPP.

Atualmente, os critérios utilizados para a classificação de resistência dos isolados de *Acinetobacter* spp., e outros patógenos bacterianos importantes, foram estabelecidos em 2011 por um comitê de especialistas em resistência aos antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012). Baseado no perfil de resistência às classes de antimicrobianos utilizados na clínica para o tratamento de infecções por *Acinetobacter* spp. (Tabela 3), estes podem ser classificados em multirresistentes (MR), extensivamente resistentes (ER) e pan resistentes (PR), onde:

- MR: isolados não sensíveis a pelo menos 1 agente em 3 ou mais classes de antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções por *Acinetobacter* spp.;
- ER: isolados não sensíveis a pelo menos 1 agente em todas as classes, mas sensível a pelo menos 1 antimicrobiano utilizado no tratamento das infecções por *Acinetobacter* spp.;
- PR: isolados não sensíveis a todos os agentes antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções por *Acinetobacter* spp.

Tabela 3. Classes de antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções por *Acinetobacter* spp.

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

Fonte: Adaptado de MAGIORAKOS et al., 2012.

2.6 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *ACINETOBACTER* SPP.

Atualmente, os elevados índices de RA, bem como as altas taxas de isolados de *Acinetobacter* MR, tornaram o tratamento de infecções causadas por este patógeno um grande desafio. Isto se deve à notória plasticidade genômica deste microrganismo, que permite o acúmulo de determinantes de resistência às principais classes de antimicrobianos utilizados na prática clínica, aliado a mecanismos intrínsecos como a expressão de sistemas de efluxo, em especial da família *resistance-nodulation-division* (RND), que apresentam uma ampla gama de substratos incluindo diversas classes de antimicrobianos, antissépticos, corantes, biocidas e detergentes (LEE et al., 2017; LIN; LAN, 2014; VIEIRA; PICOLI, 2015; MEDEIROS; LINCOPAN, 2013; COYNE; COURVALIN, PÉRICHON, 2011; RANI et al., 2017).

A baixa permeabilidade da parede bacteriana, a presença de sistemas de efluxo e a produção de enzimas hidrolisadoras e/ou modificadoras de antimicrobianos conferem ao *A. baumannii* uma resistência intrínseca a diversos antimicrobianos como ertapenem, aztreonam, aminopenicilinas, cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, e cloranfenicol (COYNE; COURVALIN, PÉRICHON, 2011; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015).

Em adição, patógenos deste gênero podem apresentar resistência adquirida a praticamente todos os antimicrobianos a qual é mediada por mutações em genes cromossômicos que levam à inativação, modificação ou superexpressão de funções celulares resultando em hiperexpressão de mecanismos intrínsecos (sistemas de efluxo e produção de beta-lactamases, como OXA-51 e AmpC); alteração da permeabilidade pela perda ou modificação de porinas da membrana externa; modificação do sítio de ligação do antimicrobiano (topoisomerasas, proteínas ribossômicas e PBPs (COYNE; COURVALIN; PÉRICHON, 2011; LUPO; HAENNI; MADEC, 2017; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015; RANI et al., 2017).

A resistência adquirida também é mediada pela aquisição de determinantes de resistência através da transferência horizontal de genes, processo facilitado por características como o grande potencial de aquisição, processamento e integração de DNA exógeno de forma estável ao cromossomo deste patógeno considerado “naturalmente competente”. Estas características são mediadas por vários fatores, como o pili do tipo IV e genes codificadores de proteínas relacionadas à competência bacteriana, que incluem *comA*, *comC*, *comB*, *comE*, *comF* e *comP* (HARDING et al., 2013; FULSUNDAR et al., 2014; SILVA; DOMINGUES, 2016; ALMASAUDI, 2018; GARCIA et al., 2018). A aquisição de elementos genéticos móveis (transposon, integron, plasmídeo) por meio de transformação natural ou conjugação é um mecanismo importante para a aquisição e disseminação de determinantes de resistência entre os patógenos. Estes elementos podem carrear genes codificadores de enzimas hidrolisadoras ou modificadoras de antimicrobianos (beta-lactamases e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos), além de mecanismos não enzimáticos (Qnr). Uma vez que estes plasmídeos geralmente suportam múltiplos determinantes de resistência, uma única conjugação é capaz de conferir um fenótipo de resistência a múltiplos antimicrobianos ao isolado receptor (RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015;

ELHOSSEINY; ATTIA, 2018; CAVALCANTI et al., 2017; LEE et al, 2017; ALMASAUDI, 2018; ROYER et al., 2018).

2.6.1 Resistência aos carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são antimicrobianos beta-lactâmicos, com atividade bacteriostática, que inibem a síntese da parede celular bacteriana. Estes fármacos são utilizados no tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. desde 1990 e são considerados antimicrobianos de escolha na terapia de infecções causadas por patógenos MR (TIAN et al., 2018; ASIF; ALVI; REHMAN, 2018). Os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos incluem a modificação ou perda de proteínas de membrana externa (Omp e CarO), modificações nos sítios de ligação (PBP), hiperexpressão de sistemas de efluxo (AdeABC, AdeFGH e AdeIJK) e produção de carbapenemases, principalmente de CHDL e MBL. O aumento da resistência mundial aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* é alarmante, sendo considerado um importante problema de saúde, pois limita drasticamente as opções terapêuticas disponíveis (LIN; LAN, 2014; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015; LEE et al., 2017; TIAN et al., 2018; ROYER et al., 2018; CAVALCANTI et al., 2017; ASIF; ALVI; REHMAN, 2018).

2.6.1.1 Beta-lactamases

As beta-lactamases, enzimas que promovem a hidrólise dos beta-lactâmicos, podem ser classificadas de acordo com suas propriedades funcionais e moleculares. A classificação descrita por Ambler é baseada na homologia dos aminoácidos, ou seja, na sua estrutura molecular, classificando-as em quatro classes principais, onde as classes A, C e D (serino carbapenemases) apresentam o aminoácido serina no seu sítio ativo, enquanto a classe B (metalo-betalactamases) apresenta um metal divalente, como o zinco (CODJOE; DONKOR, 2018; ALMASAUDI, 2018).

As enzimas denominadas carbapenemases, por sua vez, consistem em beta-lactamases pertencentes às classes A, B e D de Ambler que apresentam amplo espectro de ação e a propriedade comum de hidrolisar os carbapenêmicos. A

produção de carbapenemase é considerada o mecanismo de resistência mais relevante no panorama atual de emergência de cepas de *A. baumannii* MR (VIEIRA; PICOLI, 2015; CODJOE; DONKOR, 2018). No início da década de 1990, todas as carbapenemases descritas eram codificadas cromossomicamente, no entanto, posteriormente a presença de carbapenemases codificadas por genes plasmidiais foi detectada, alterando os padrões de disseminação destas enzimas. Quando associados à elementos genéticos móveis, como *insertion sequences* (IS), transposons, integrons e plasmídeos, o potencial de disseminação destes determinantes de resistência dentro do gênero *Acinetobacter* por transposição e transferência horizontal de genes é aumentado. Além disso, as IS podem atuar como sequências promotoras destes genes, aumentando sua expressão e reduzindo adicionalmente a sensibilidade aos carbapenêmicos (ZANDER et al., 2014a; QUEENAN; BUSH, 2007; VIEIRA; PICOLI, 2015; CORTIVO et al., 2015; ESCANDÓN-VARGAS et al., 2016; ROYER et al., 2018).

2.6.1.1.1 Classe A de Ambler

As enzimas da classe A de Ambler podem ser classificadas em *narrow-spectrum beta-lactamases* (NSBLs) que hidrolisam cefalosporinas de espectro limitado, *extended-spectrum beta-lactamases* (ESBLs) que conferem resistência à penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, e enzimas com atividade de carbapenemase as quais são capazes de hidrolisar uma ampla variedade de beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas e monobactâmicos, e todas estas enzimas podem ser inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam. Em *Acinetobacter* as enzimas da classe A mais comumente identificadas são *Pseudomonas Extended Resistant* (PER-1, -2, -3, -7, -8), *Vietnam Extended-spectrum Beta-lactamase* (VEB-1, -3, -7) e *Guiana Extended Spectrum* (GES-1, -5, -11, -12, -14, -22), a qual apresenta algumas variantes com atividade de carbapenemase. E menos frequentemente *Temoniera beta-lactamase* (TEM-92, -116), *Sulphydryl-Variable beta-lactamase* (SHV-5, -12), *Cefotaxime Munich* (CTX-M-2, -15, -43), além da enzima *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase* (KPC-2, -3, -4, -10) (DJAHMI et al., 2014; POTRON; POIREL;

NORDMANN, 2015; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015; RIBEIRO et al., 2016; WENZLER et al., 2017; ALMASAUDI, 2018).

A enzima GES (GES-1) foi descrita pela primeira vez em 1998 em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* da Guiana Francesa, e desde então tem sido reportada em várias espécies de bactérias Gram-negativas. Atualmente, foram descritas 31 variantes enzimáticas de GES (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, último acesso: 31/01/2019), dentre as quais algumas variantes apresentam atividade hidrolítica frente aos carbapenêmicos (GES-2, -4, -5, -6, -11, -12 -14, -15, -16, -18, -20, -21, -22 e -24) (KESSIS et al., 2014; ESCANDÓN-VARGAS et al., 2016; WENZLER et al., 2017). Em *Acinetobacter* spp. o gene codificador desta enzima pode estar associado a integrons de classe 1 e/ou plasmídeos. A variante GES-14, localizada em plasmídeo, consiste na primeira beta-lactamase descrita capaz de hidrolisar todos os beta-lactâmicos, em decorrência de substituições de aminoácidos (Gli170Ser and Gli243Ala) (BOGAERTS et al., 2010; ESCANDÓN-VARGAS et al., 2016; LEE et al., 2017; PAGANO; MARTINS; BARTH, 2016; BONNIN et al., 2011; IBRAHIM, 2019).

A enzima KPC (KPC-1, sequência posteriormente reconhecida como idêntica à KPC-2) foi identificada pela primeira vez em 1996 em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos nos EUA, durante o estudo de vigilância do ICARE (*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*) (ESCANDÓN-VARGAS et al., 2016). Esta carbapenemase da classe A de Ambler, apresenta atualmente 20 variantes enzimáticas descritas (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, último acesso: 21/01/2019). Na literatura, os relatos de *Acinetobacter* spp. carreando genes codificadores da enzima KPC são raros. A primeira detecção do gene no gênero foi em 2009 em isolados clínicos do complexo Abc em Porto Rico, nos quais foram identificadas os genes codificadores de KPC-2, -3, -4 e -10 (ROBLEDO et al., 2010; ROBLEDO; AQUINO; VÁZQUEZ, 2011; WONG et al., 2017; WENZLER et al. 2017). No Brasil, as variantes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{KPC-3} foram detectadas em isolado clínicos de *A. baumannii* no Maranhão (RIBEIRO et al., 2016).

2.6.1.1.2 Classe B de Ambler

As enzimas da classe B de Ambler ou metaloenzimas apresentam capacidade hidrolítica frente a todos os beta-lactâmicos, exceto monobactâmicos, são resistentes aos inibidores de beta-lactamase comercialmente disponíveis, no entanto, sua atividade é inibida por agentes quelantes de metais, como o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e o ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) (DOBRZANIECKA et al., 2014; LEE et al., 2017; ALMASAUDI, 2018). Atualmente, as enzimas IMP, VIM, NDM e GIM apresentam, respectivamente, 52 (IMP-1 a IMP-58), 48 (VIM-1 a VIM-51), 16 (NDM-1 a NDM-16) e 2 (GIM-1 e GIM-2) variantes enzimáticas descritas (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, último acesso: 31/01/2019). Geralmente localizadas em elementos genéticos móveis, as principais MBLs identificadas em *Acinetobacter* spp. são *Imipenemase* (IMP-1, -2, -4, -5, -6, -8, -11, -14, -19, -55) detectada na Europa, Ásia e América Latina; *Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase* (VIM-1, -2, -3, -4, -6, -11) na Ásia e Europa; e *New Delhi Metallo-beta-lactamase* (NDM-1, -2) na Ásia, Europa e África. Além destas, as enzimas *Seoul Imipenemase* (SIM-1) na Ásia e *German Imipenemase* (GIM-1) na Europa também foram descritas em isolados de *Acinetobacter* spp. (ZARRILI et al., 2013; POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; PAGANO, MARTINS; BARTH, 2016; WENZLER et al., 2017; SHIN; PARK, 2017; ALMASAUDI, 2018; SOLTANI et al., 2018; REZAEI et al., 2018). No Brasil, já foram detectados os genes codificadores das enzimas IMP-1 (TOGNIM et al., 2006; CAYÔ, et al, 2018), IMP-10 (CAYO et al., 2015) e NDM-1 (PILLONETTO et al., 2014; PAGANO et al. 2015; CHAGAS et al., 2015).

2.6.1.1.3 Classe C de Ambler

As enzimas da classe C de Ambler, também conhecidas como cefalosporinases cromossômicas do tipo AmpC ou *Acinetobacter-Derived Cephalosporinase* (ADC-1, -3, -4, -6, -7, -11, -26, -30, -33, -56, -57, -68, -73, -76, -77, -81), são enzimas intrínsecas produzidas em níveis basais pelo *Acinetobacter*, que apresentam capacidade de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de espectro limitado. As enzimas AmpC, ao contrário do observado em outros microrganismos

Gram-negativos, não são induzíveis em *Acinetobacter*, sendo sua hiperexpressão regulada pela presença de um elemento IS*Aba1* ou IS*1135* à montante do gene, promovendo resistência à penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro. Algumas variantes da enzima ADC, como ADC-33 e ADC-56, apresentam adicionalmente atividade hidrolítica à cefalosporinas de quarta geração (cefepime), sendo denominadas de *Extended-Spectrum AmpC* (ESAC) (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015; WENZLER et al., 2017; SHIN; PARK, 2017; ALMASAUDI, 2018).

2.6.1.1.4 Classe D de Ambler

As enzimas da classe D de Ambler, também denominadas oxacilinasas (OXA), podem ser classificadas em *Narrow-Spectrum Oxacillinases* (NS-OXA) que apresentam atividade hidrolítica frente a penicilinas, cefalosporinas de limitado e amplo espectro, *Extended-Spectrum Oxacillinases* (ES-OXA) que são capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, e em CHDLs que são enzimas com atividade intrínseca de carbapenemases, que hidrolisam penicilinas e carbapenêmicos, as quais, geralmente, não são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam, enquanto podem ser inibidas *in vitro* pelo cloreto de sódio (NaCl). As CHDLs consistem nas beta-lactamases adquiridas mais prevalentes no gênero *Acinetobacter* e a principal causa de resistência aos carbapenêmicos neste patógeno (VALA et al., 2014; POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015; DJAHMI et al., 2014; ALMASAUDI, 2018).

As CHDLs são responsáveis por promover a redução da sensibilidade aos carbapenêmicos, uma vez que, normalmente, a maioria dos isolados de *Acinetobacter* expressam fracamente estas enzimas. Níveis clinicamente relevantes de resistência aos carbapenêmicos frequentemente observada em isolados de *Acinetobacter* se devem à hiperexpressão destes genes associada a outros mecanismos de resistência, que incluem perda/modificação de porinas, hiperexpressão de sistemas de efluxo, bem como presença de outras carbapenemases (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; WENZLER et al., 2017). Em *Acinetobacter* spp. as principais CHDLs identificadas podem ser subdivididas em

seis grupos: OXA-23-like, OXA-51-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-143-like e OXA-235-like (Tabela 4).

Além das CHDLs adquiridas, algumas espécies de *Acinetobacter* apresentam a ocorrência natural de genes codificadores de carbapenemases do tipo CHDLs, como é o caso das espécies *A. baumannii* (*bla*_{OXA-51-like}), *A. radioresistens* (*bla*_{OXA-23}), *A. Iwoffii* (*bla*_{OXA-134}), *A. johnsonii* (*bla*_{OXA-211}), *A. calcoaceticus* (*bla*_{OXA-213}), *A. haemolyticus* (*bla*_{OXA-214}), *A. bereziniae* (*bla*_{OXA-228-like}), *A. schindleri* (*bla*_{OXA-235-like}), *A. rudis* (*bla*_{OXA-665}), *A. bohemicus* (*bla*_{OXA-296}), *A. tandoii* (*bla*_{OXA-664}), *A. guillouiae* (*bla*_{OXA-274}) e *A. gyllenbergii* (*bla*_{OXA-286}), cuja identificação destes fornecem ferramentas adicionais para a identificação de espécies de *Acinetobacter* (BONNIN et al., 2012; ZANDER et al, 2014; ZANDER et al, 2014a; EVANS; AMYES, 2014; TIAN et al., 2018). Estes genes intrínsecos podem ser capturados por IS e se tornarem genes de resistência adquiridos, que têm o potencial de evoluir e expandir seu espectro de atividade, apresentando taxas de resistência aumentada mediada por mutações, como demonstrado para o gene *bla*_{OXA-51} (TIAN et al, 2018; LEE et al., 2012; CODJOE; DONKOR, 2018).

A primeira CHDL identificada foi inicialmente denominada *Acinetobacter Resistant to Imipenem* (ARI-1) e posteriormente renomeada OXA-23, após análise de sequenciamento revelar que se tratava de uma beta-lactamase da classe D de Ambler. O primeiro relato desta enzima foi em um isolado clínico de *A. baumannii* resistente à imipenem na Escócia em 1985, curiosamente no mesmo ano em que o imipenem foi aprovado para uso clínico (PATON et al., 1993; SCAIFE et al., 1995). Atualmente, foram descritas 26 variantes enzimáticas (POIREL et al., 2008; <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, último acesso: 31/01/2019), as quais podem ser encontradas integradas ao cromossomo bacteriano ou inseridas em plasmídeos. O gene *bla*_{OXA-23-like} pode estar associado a IS*Aba*1 ou IS*Aba*4, compondo os contextos genéticos relatados na literatura como responsáveis pela sua disseminação (Tn2006, Tn2007, Tn2008, Tn2008B, Tn2009) (CORVEC et al, 2007; CHEN et al, 2017; DJAHMI et al., 2014; NIGRO; HALL, 2016). Estas enzimas são capazes de hidrolisar cefalosporinas de segunda geração (cefuroxima e cefoxitina), penicilinas de amplo espectro (ampicilina e amoxicilina), piperacilina, oxacilina, monobactâmicos (aztreonam) e carbapenêmicos, e a variante OXA-146, adicionalmente, hidrolisa cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima),

Tabela 4. Variantes enzimáticas de beta-lactamases da classe D hidrolisadoras de carbapenêmicos

| 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-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-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, OXA-236, OXA-237 |

Fonte: HIGGINS et al, 2013; JUNE et al., 2016; POIREL et al., 2008; SILVA et al., 2002 – ainda não publicado; <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, último acesso: 31/01/2019.

sendo a primeira carbapenemase do tipo CHDL detectada com atividade hidrolítica comparável à ESBLs (EVANS; AMYES, 2014; KAITANY et al, 2013). Considerada a subclasse de CHDL adquirida mais comum em *A. baumannii*, a presença de IS_{Aba} a montante dos genes codificadores desta enzima podem atuar na regulação de sua expressão gênica, conferindo elevadas taxas de resistência aos carbapenêmicos

(EVANS; AMYES, 2014; ZANDER et al, 2014a; NIGRO; HALL, 2016). No Brasil, foi detectada pela primeira vez em isolados clínicos recuperados no ano de 1999 na cidade de Curitiba e desde então se disseminou pelo país (DALLA-COSTA et al., 2003). Embora seja considerada a CHDL adquirida mais prevalente e o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em isolados clínicos de *A. baumannii*, alguns hospitais brasileiros tem reportado um perfil diferente, com predomínio da OXA-143 (ROYER et al., 2018; CAYÔ et al., 2015; CARVALHO et al., 2016; SCHUERTZ et al., 2018).

A enzima OXA-24/40 foi inicialmente descrita em um isolado de CRAb recuperado do ano de 1997 na Espanha (BOU; OLIVER; BELTRAN, 2000). Atualmente, foram descritas 9 variantes enzimáticas (SILVA et al., 2002 – ainda não publicado; <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, último acesso: 31/01/2019), as quais apresentam capacidade hidrolítica contra penicilinas (benzilpenicilina), cefalosporinas de primeira geração (cefaloridina) e carbapenêmicos, e sua atividade enzimática pode ser inibida por íons cloreto e pelos inibidores de beta-lactamases tazobactam, sulbactam e ácido clavulânico (BOU; OLIVER; BELTRAN, 2000; EVANS; AMYES, 2014). No Brasil, a primeira detecção ocorreu em São Paulo em um isolado clínico de *Acinetobacter* spp. de 2007 (MENDES et al., 2008), e desde então foi identificado em Pernambuco (CAVALCANTI et al., 2013), Paraná (PAGANO, et al., 2017), Rio Grande do Sul (PAGANO et al., 2016; PAGANO et al., 2018) e Minas Gerais (AZEVEDO et al., 2018).

A enzima OXA-51, por sua vez, foi descrita pela primeira vez em isolados clínicos de CRAb recuperados do período de 1993 à 1994 na Argentina (BROWN; YOUNG; AMYES, 2005). O gene *bla*_{OXA-51} é utilizado como marcador genético para a identificação presuntiva da espécie *A. baumannii*, por se tratar de uma carbapenemase intrínseca da espécie. Com a descrição deste gene em isolados de *Acinetobacter nosocomialis* (genomospecie 13TU) em Taiwan, pode não ser apropriada sua utilização para a discriminação de espécies, entretanto, vários autores utilizam esta abordagem e alegam não interferir na análise e conclusão dos resultados, uma vez, que se trata de um gene intrínseco à espécie e que os relatos em espécie não-*baumannii* são raros (TURTON et al., 2006; SOHRABI et al., 2012; LEE et al., 2009; LEE et al., 2012; CASTILHO et al., 2017; RANI et al., 2018).

Atualmente, foram descritas 160 variantes enzimáticas (JUNE et al., 2016; <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, último acesso: 31/01/2019), as quais são codificadas por cromossomos e plasmídeos, e o elevado número de variantes sugere que estas enzimas tem estado sob considerável pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos levando a ocorrência de novas variantes, que provavelmente apresentam atividade hidrolítica variada. Apenas a presença do gene *bla*_{OXA-51-like}, devido sua baixa atividade hidrolítica, não é capaz de promover resistência aos carbapenêmicos, no entanto, quando associado a IS*Aba1* foi observado o aumento da concentração inibitória mínima (CIM) aos carbapenêmicos (TURTON, 2006a; EVANS; AMYES, 2014; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015).

A enzima OXA-58 foi relatada inicialmente na França, em 2003, em um isolado clínico de CRAb (POIREL et al, 2005). Atualmente, foram descritas 7 variantes enzimáticas (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, último acesso: 31/01/2019), as quais apresentam baixa atividade hidrolítica contra penicilinas e carbapenêmicos, são capazes de hidrolisar algumas cefalosporinas de primeira (cefalotina) e quarta geração (cefpiroma), mas não outras como ceftazidima, cefotaxima (terceira geração) e cefepime (quarta geração). A presença de outros mecanismos simultaneamente permite a identificação de altos níveis de resistência aos carbapenêmicos (POIREL et al, 2005; EVANS; AMYES, 2014). O gene codificador desta enzima pode estar associado a IS do tipo IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba125* e IS*18*, no entanto, é comumente relatado o mesmo estar flanqueado em ambos os lados por IS*Aba3-like* formando um transposon composto. Normalmente, a IS*Aba3* a montante do gene é interrompida por outra IS, como a IS*Aba2*, IS*Aba125*, IS*Aba825*, IS*1008* e IS*18*, onde estes elementos apresentam promotores híbridos que podem regular a expressão do gene, conferindo níveis de resistência variados (POIREL et al, 2005; POIREL, NORDMANN, 2006; EVANS; AMYES, 2014; PAGANO; MARTINS; BARTH, 2016). No Brasil, a primeira detecção foi realizada em um isolado clínico de *A. baumannii* de 2007 (GUSATTI et al., 2012), e desde então tem sido detectada esporadicamente em isolados clínicos e ambientais de *A. baumannii* (FIGUEIREDO et al., 2011; ANTONIO et al., 2011; CASTILHO et al., 2017) e *A. seifertii* (CAYÔ et al., 2016; NARCISO et al., 2017).

A enzima OXA-143 teve sua primeira descrição em 2004, no Brasil, em um isolado clínico de CRAB, que não apresentava nenhuma classe de CHDLs até então conhecida (HIGGINS et al., 2009). Atualmente, foram descritas 6 variantes enzimáticas (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, último acesso: 31/01/2019), as quais são capazes de hidrolisar penicilinas e carbapenêmicos. O gene codificador desta enzima pode estar associado à presença de IS*Aba*1 (HIGGINS et al, 2009; EVANS; AMYES, 2014). No Brasil, a OXA-143 é a segunda CHDL adquirida mais prevalente em isolados de *A. baumannii* (VASCONCELOS et al., 2015; CAYÔ et al., 2015; AZEVEDO et al., 2018). Além da OXA-143 descrita em São Paulo e Rio de Janeiro, foram detectadas as variantes OXA-231 no Paraná (GIONCO et al., 2012) e OXA-253 em Minas Gerais (GIRLICH et al., 2014), Pernambuco (CAVALCANTI et al., 2017) e Paraná (ROMANIN, 2018).

A enzima OXA-235, CHDL intrínseca de *A. schindleri*, foi descrita pela primeira vez por Higgins e colaboradores (2013), num estudo utilizando isolados de *A. baumannii* recuperados em hospitais do EUA e México entre 2005 e 2009, onde além da detecção desta nova classe, foi identificada a existência de duas variantes (OXA-236 e OXA-237). Atualmente, foram descritas 3 variantes enzimáticas (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>; HIGGINS et al, 2013), as quais são capazes de hidrolisar penicilinas e carbapenêmicos, mas não cefalosporinas de amplo espectro. O gene codificador desta enzima está associado a IS*Aba*1 (HIGGINS et al, 2013; POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). Até a data, não há relato deste gene no Brasil.

2.6.2 Resistência aos Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos utilizados no tratamento de uma ampla gama de infecções cuja atividade é dependente da ligação deste fármaco ao 16S rRNA. O mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos mais prevalente é a modificação dos grupamentos amino ou hidroxila pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs). As AMEs consistem em acetiltransferases (AAC), nucleotidiltransferases (ANT) ou adeniltransferases (AAD), e fosfotransferases (APH), as quais já foram descritas em *Acinetobacter* spp. Os genes codificadores destas enzimas, geralmente, estão inseridos em elementos

genéticos móveis, identificados frequentemente em integrons de classe 1 (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015; ASIF, ALVI, REHMAN, 2018; ALMASAUDI, 2018; LEE et al., 2017).

Genes codificadores de 16S rRNA metiltransferases (metilases), como *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtD2*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* e *npmA*, têm sido identificados em *Acinetobacter* spp. e são responsáveis pela metilação do 16S rRNA, modificando o alvo do antimicrobiano, conferindo alto nível de resistência aos aminoglicosídeos, exceto neomicina. Estes genes, normalmente, estão inseridos em transposons os quais, por sua vez, em plasmídeos conjugáveis, o que facilita a disseminação destes determinantes. Outros mecanismos envolvidos na resistência aos aminoglicosídeos incluem a diminuição da permeabilidade da membrana externa, alterações nas proteínas ribossômicas, bem como hiperexpressão de sistemas de efluxo (AdeABC, AbeM) (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015; SHIN; PARK, 2017; ALMASAUDI, 2018; ASIF, ALVI, REHMAN, 2018).

2.6.3 Resistência às Quinolonas

O principal mecanismo responsável por conferir resistência às quinolonas consiste em mutações cromossômicas pontuais nos genes *gyrA* (Ser83Leu) e *parC* (Ser80Leu e Glu84Lis), codificadores da DNA-girase e da topoisomerase IV, respectivamente, com consequente redução da afinidade ao antimicrobiano conferindo altos níveis de resistência. Em *Acinetobacter*, a diminuição da permeabilidade (OMPs) e a hiperexpressão de sistemas de efluxo (AdeABC, AdeIJK, AbeM) também desempenham um papel importante na resistência às quinolonas. Outros mecanismos de resistência descritos em *A. baumannii* incluem os genes *Quinolone Resistance* (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*), mediados por plasmídeos, os quais codificam proteínas que se ligam a DNA-girase e a topoisomerase IV, impedindo a ligação das quinolonas à estas estruturas (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015; ASIF, SHIN; PARK, 2017; ALVI, REHMAN, 2018; ALMASAUDI, 2018; LUPO; HAENNI; MADEC, 2018).

2.6.4 Resistência às Tetraciclinas e Glicilglicinas

Pertencente à classe das tetraciclinas, a minociclina foi introduzida pela primeira vez na prática clínica para tratamento de infecções por *Acinetobacter* na década de 1960. O mecanismo de resistência às tetraciclinas em *Acinetobacter baumannii* ocorre, principalmente, mediado pela hiperexpressão de sistemas de efluxo (TetA, TetB, AdeABC) e pela ação de proteínas de proteção ribossômica (TetM) que protegem o ribossomo da ação das tetraciclinas por meio da alteração da conformação do seu sítio de ligação no 16S rRNA, promovendo sua dissociação do ribossomo e impedindo sua religação (DÖNHÖFER et al., 2012; SHIN; PARK, 2017; ALMASAUDI, 2018).

O antimicrobiano tigeciclina, pertencente à classe das glicilglicinas, consiste em uma tetraciclina modificada, que teve seu uso aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2005 para o tratamento de infecções complicadas da pele, infecções intra-abdominais e pneumonia adquirida na comunidade. Este agente apresenta atividade contra uma ampla variedade de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo anaeróbios, sendo utilizado também no tratamento de bacteremias e ITU por bactérias Gram-negativas MR. Sua atividade bacteriostática é mediada pela ligação à subunidade ribossomal 30S. Assim como a tetraciclina, a tigeciclina também é substrato do sistema de efluxo AdeABC, bem como dos sistemas AdeFGH e AdeIJK (ASIF; ALVI; REHMAN, 2018; ALMASAUDI, 2018; LEE et al., 2017).

2.6.5 Resistência às Polimixinas

Frente ao panorama clínico atual, devido as opções terapêuticas estarem extremamente limitadas pela resistência aos antimicrobianos, poucas opções efetivas estão disponíveis para o tratamento das infecções causadas por CRAb. Esta situação levou a renovação do interesse clínico pelas polimixinas, que assim como a tigeciclina, são consideradas os antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções por estes microrganismos (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; VIEIRA; PICOLI, 2015; LIN; LAN, 2014; ELHOSSEINY; ATTIA, 2018; ZHANG et al., 2018; ASIF, ALVI, REHMAN, 2018).

A classe das polimixinas é constituída por polimixinas A, B, C, D e E, das quais apenas as polimixinas B e, principalmente, E (colistina), são utilizadas na prática clínica. Estes antimicrobianos foram descobertos na década de 1950, no entanto, efeitos adversos que incluem nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ataxia, apnéia, parestesias, vertigens, convulsões, entre outros, levaram ao seu desuso (REBELO et al, 2018; ASIF, ALVI, REHMAN, 2018). Consideradas agentes bactericidas, estes peptídeos catiônicos atuam na membrana externa bacteriana, onde interagem com os lipopolissacarídeos (LPS), promovendo a retirada de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} responsáveis pela estabilização desta membrana, resultando na perda da integridade desta membrana, e consequente morte celular bacteriana (SRINIVAS; RIVARD, 2017; ASIF, ALVI, REHMAN, 2018).

Desde a primeira descrição de um isolado de *Acinetobacter* spp. resistente à colistina na República Tcheca em 1999, vários relatos foram feitos no decorrer dos anos no mundo, ressaltando a habilidade deste patógeno em adquirir resistência à diversas classes de antimicrobianos. Em *Acinetobacter* spp. a resistência às polimixinas pode ser mediada por diferentes mecanismos, que incluem a hiperexpressão de sistemas de efluxo (EmrAB, Ttg2C), mutações gênicas (*pmrCAB*, *lpxACD*, *lpsB*, *vacJ*, *lptD*), bem como regulação negativa da expressão de cofatores envolvidos na síntese do LPS (biotina) e de proteínas que atuam no transporte e/ou estabilização de precursores da membrana externa (aminoácidos osmoprotetores). A mutação nos genes *pmrA* e *pmrB* são considerados um dos principais mecanismos de resistência às polimixinas uma vez que estas mutações são responsáveis por ativar de forma constitutiva o sistema de dois componentes PmrAB, que aumenta a expressão do gene *pmrC* que promove a adição de fosfoetanolamina (PEtN) ao lípido A, bem como aumenta a expressão do gene *naxD*, que atua na síntese de galactosamina (GalN) que também é adicionada ao lípido A do LPS. A adição destes (PEtN e GalN) promove uma diminuição da carga negativa do LPS e consequentemente reduz a afinidade do fármaco com a parede celular bacteriana. Outro mecanismo de resistência às polimixinas, até então, descrito apenas em *Acinetobacter* spp. envolve a perda completa da síntese do LPS, que se dá pela mutação e consequente inativação dos genes envolvidos na síntese desta estrutura (*lpxA*, *lpxC* e *lpxD*) (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015;

SRINIVAS; RIVARD, 2017; SHIN; PARK, 2017 GIARDELLO et al., 2017; LIMA et al., 2018).

Recentemente os genes *lpsB*, *lptD* e *vacJ* foram relacionados com a resistência às polimixinas. Embora ainda pouco estudados, há relatos de que a mutação do gene *lpsB* promove a hiperexpressão de glicosiltransferases, responsável pela síntese dos anéis estruturais do LPS, os quais estão associados à menor fluidez e maior resistência osmótica da membrana externa. Em adição, as mutações nos genes *lptD* e *vacJ* estão relacionadas à perda da habilidade de transporte do LPS do citosol para a membrana externa mediada por translocases, e perda da simetria lipídica na membrana externa, respectivamente. Esses mecanismos, em sua maioria, são responsáveis pela redução da afinidade de ligação da colistina ao seu alvo, com consequente fenótipo de resistência (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; SRINIVAS; RIVARD, 2017; SHIN; PARK, 2017; LIMA et al., 2018).

Em 2016, Liu e colaboradores relataram o primeiro caso de um mecanismo de resistência à colistina adquirido mediado por plasmídeo em um isolado de *E. coli* de 2015 na China, designado como *plasmid-Mediated Colistin Resistance (mcr-1)*, responsável por codificar uma fosfoetanolamina transferase que medeia a adição de PEtN ao lipídeo A, conferindo resistência ao antimicrobiano (CIM de 4 a 16 µg/mL). A relação evolutiva entre *mcr-1* e a fosfoetanolamina transferase de bactérias produtoras de polimixina, *Paenibacillus* spp., sugere uma transferência potencial do gene do cromossomo desta bactéria para *E. coli* (LIU et al., 2016; REBELO et al., 2018). Atualmente, tem aumentado o número de descrições de variantes dos genes relacionados com a resistência às polimixinas mediados por plasmídeos tais como: *mcr-1* (-1.1 a -1.17), *mcr-2* (-2.1 e -2.2), *mcr-3* (-3.1 a -3.25), *mcr-4* (-4.1 a -4.6), *mcr-5* (-5.1 a -5.3), *mcr-6*, *mcr-7* e *mcr-8* (-8.1 e -8.2), dos quais nenhum foi identificado em *Acinetobacter* spp. (WANG et al., 2018; MULVEY et al., 2018; FERNANDES et al., 2018; CHAVDA et al., 2018). O número crescente destes genes e a diversidade de plasmídeos em que estes genes estão inseridos, descritos em Enterobacteriaceae em diferentes continentes, demonstram o alto potencial de disseminação desse gene. Além disso, é alarmante a possibilidade de aquisição deste mecanismo por isolados de Enterobacteriaceae produtores de carbapenemases possibilitando a disseminação de microrganismos

PR, limitando ainda mais o tratamento das infecções por estes patógenos. Além disso, a emergência de *A. baumannii* PR, destaca a necessidade de investigar novas opções terapêuticas para o tratamento destes patógenos (LIU et al., 2016; LIN; LAN, 2014; ZHANG et al., 2018; REBELO et al, 2018; LIMA et al., 2018).

2.6.6 Elementos Genéticos Móveis

Os elementos genéticos móveis, que incluem IS, transposons, integrons e plasmídeos, são elementos importantes que contribuem para a aquisição, acúmulo e disseminação de determinantes de resistência aos antimicrobianos, frequentemente encontrados em isolados clínicos de *Acinetobacter*. São elementos capazes de promover a mobilidade do DNA intracelular (cromossomo para o plasmídeo, vice-versa, ou entre plasmídeos), bem como a mobilidade intercelular (conjugação e transformação), sendo considerados uma das principais causas de mutações e rearranjos genômicos, que podem resultar em alterações na expressão gênica (FULSUNDAR et al., 2014; ZHAO; HU, 2015; CAG et al., 2016; ALMASAUDI, 2018; PAGANO; MARTINS; BARTH, 2016; PATRIDGE et al., 2018).

2.6.6.1 Sequências de inserção

As IS são geralmente pequenos elementos móveis, que variam de 500bp a 2.000bp, que desempenham um papel importante na mobilização e expressão de determinantes de resistência e virulência. Consiste em sequências repetidas invertidas de DNA que flanqueiam, normalmente, um (ou dois) gene codificador da transposase (*tnp*), uma recombinase responsável pela mobilização desta estrutura intracelularmente (Figura 1). Adicionalmente, quando localizados à montante de genes codificadores de resistência, as IS podem atuar como promotores, ativando genes silenciosos ou promovendo o aumento da expressão gênica e conferindo redução da sensibilidade ao antimicrobiano (ZHAO; HU, 2015; CAG et al., 2016; SOHRABI et al., 2012; ZANDER et al., 2014; TURTON et al., 2006b; EVANS; AMYES, 2014; PAGANO; MARTINS; BARTH, 2016; PATRIDGE et al., 2018).



Figura 1. Estrutura de sequências de inserção. Representação esquemática da estrutura de sequências de inserção, com gene codificador da transposase flanqueado por sequências repetidas invertidas de DNA.

Fonte: Autoria própria.

A presença de IS em *A. baumannii* tem um papel relevante na aquisição de novos fenótipos de resistência, que em conjunto com o potencial destes microrganismos em adquirir material genético exógeno, conferem-lhe a plasticidade genômica que contribui para o seu sucesso (TURTON et al, 2006a; EVANS; AMYES, 2014). Em *Acinetobacter* spp., as IS*Aba*1, IS*Aba*2, IS*Aba*3, IS*Aba*4 e IS18 são comumente associadas à expressão de genes de resistência, e podem estar inseridas em outros elementos genéticos, como transposons e plasmídeos (EVANS; AMYES, 2014; PAGANO; MARTINS; BARTH, 2016).

2.6.6.2 Transposons

Os transposons são elementos semelhantes às IS, entretanto apresentam de 3kb a 40kb. Consistem em uma estrutura capaz de mobilizar uma diversidade de genes que são flanqueados por IS em ambas as extremidades. Esta mobilização intracelular pode ser mediada por um mecanismo replicativo, catalisado pela TnpA, gerando múltiplas cópias do transposon. Em *A. baumannii*, estes elementos são frequentemente associados à disseminação e regulação da expressão de importantes determinantes de resistência, como o *bla*_{OXA-23} que incluem os Tn2006, Tn2007, Tn2008 e Tn2009, como os principais transposons, dos quais apenas o Tn2007 não é flanqueado por IS*Aba*1 à montante do gene (CAG et al., 2016; PAGANO; MARTINS; BARTH, 2016; CHEN et al., 2017; PATRIDGE et al., 2018).

2.6.6.3 Integrons

Os integrons são elementos genéticos associados à múltipla resistência aos antimicrobianos, devido capacidade de apresentar em sua estrutura

vários cassetes gênicos os quais são mobilizados por meio de um sistema de recombinação sítio-específico. São compostos por um gene codificador de integrase (*intI*) capaz de reconhecer os sítios de recombinação *attI* (integron) e *attC* (genes cassete) e promover a inserção ou remoção do cassete; e uma sequência promotora (Pc) para expressão dos genes cassetes. O cassete gênico consiste em genes associados a um elemento de 59 bases (59-be ou *attC*) que permite a integração desta estrutura ao integron. Com base nas sequências de aminoácidos das integrases os integrons são classificados em classes e dentre as 5 classes descritas, sabe-se que apenas as classes I (*intI1*), II (*intI2*) e III (*intI3*) apresentam um papel importante na disseminação de determinantes de resistência (HALL, COLLIS, 1995; ZHAO; HU, 2015; DENG et al., 2015; CAG et al., 2016; PAGANO. MARTINS; BARTH, 2016; PATRIDGE et al., 2018).

Todos os integrons apresentam na extremidade 5'-CS uma plataforma funcional (*intI*-Pc-*attI*) composta por uma integrase (*intI*), um sítio promotor (Pc), e um sítio de reconhecimento *attI*; no entanto, possuem segmentos 3'-CS distintos (Figura 2). Os integrons de classe I são os mais frequentes em isolados clínicos de *A. baumannii* e apresentam na extremidade 3'-CS os genes *qacEΔ1*, *sull* e ORF5, os quais codificam resistência a quaternário de amônio, sulfonamidas e função desconhecida, respectivamente. Além disso, estão associados aos transposons Tn402-like e transposons da família Tn3. Os integrons de classe II, comumente associados à transposons da família Tn7, em sua composição clássica contém uma série de cassetes gênicos que incluem *dfrA1*, *sat1* e *aadA1*, que conferem resistência a trimetoprim, estreptotricina e estreptomina/espectinomicina, respectivamente. Na extremidade 3'-CS apresentam cinco genes *tns* (*tnsA*, *tnsB*, *tnsC*, *tnsD* e *tnsE*) que atuam na mobilidade desta estrutura. Os integrons de classe III, por sua vez, também estão associados aos transposons Tn402-like, no entanto, seu segmento 3'-CS não foi caracterizado (ZHAO; HU, 2015; DENG et al., 2015; CAG et al., 2016; PAGANO; MARTINS; BARTH, 2016; PATRIDGE et al., 2018; HALAJI et al., 2018).

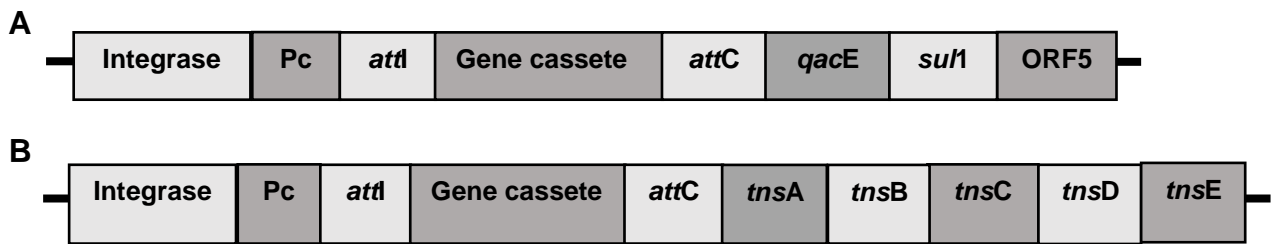


Figura 2. Estrutura de (A) integron de classe 1 e (B) integron de classe 2. Representação esquemática de integrons de classe 1 e de classe 2 compostos no segmento 5'-CS por um gene codificador de integrase, uma sequência promotora (Pc) e um sítio de reconhecimento (*attI*), seguidos por um gene cassete e seu sítio de reconhecimento (*attC*). O integron de classe 1 (A) apresenta no segmento 3'-CS genes codificadores de resistência a quarternário de amônio (*qacE*Δ1), sulfonamidas (*sulI*) e ORF5 de função desconhecida. O integron de classe 2 (B) apresenta genes associados a mobilidade da estrutura (*tnsA*, *tnsB*, *tnsC*, *tnsD* e *tnsE*).

Fonte: Autoria própria.

2.6.6.3.1 Plasmídeos

Os plasmídeos consistem em moléculas de DNA circulares extracromossomais com capacidade auto-replicativa, composto por genes acessórios bacterianos responsáveis por codificar características diversas, que auxiliam na adaptação e persistência bacteriana. São considerados importantes vetores para outros elementos genéticos móveis, como IS, transposons e integrons, que podem ser transferidos horizontalmente por meio da transformação ou conjugação (HALL et al., 2017; PATRIDGE et al., 2018).

2.7 DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA DE *ACINETOBACTER* SPP.

Além da resistência aos antimicrobianos, alguns fatores de virulência são fundamentais e contribuem para a manutenção de *Acinetobacter* spp. no ambiente hospitalar e explica em parte seu potencial em causar surtos de infecção. Os principais fatores de virulência descritos em *Acinetobacter* spp. são: formação de biofilme, motilidade, encapsulamento, presença de proteínas de membrana externa e de lipooligossacarídeos, bem como sistemas de aquisição de metais e de secreção de proteínas (EDCD, 2015; AL ATROUNI et al., 2016; LEE et al., 2017; WENZLER et al., 2017; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; ALMASAUDI, 2018).

Os fatores de virulência contribuem para a patogênese, possibilitando uma interação bem-sucedida entre patógeno e hospedeiro, com consequente colonização, bem como infecção. Além disso, *Acinetobacter* spp. apresenta grande capacidade de sobrevivência sob condições ambientais variáveis por períodos prolongados e resistir a condições de dessecação devido a associação de diferentes mecanismos, como a produção de polissacarídeos capsulares, hiperexpressão de proteínas envolvidas na resistência aos antimicrobianos, hiperexpressão de sistemas de efluxo, formação de biofilme e regulação negativa de proteínas envolvidas no ciclo celular, transcrição e tradução, fazendo com que o microrganismo entre em estado de latência. Estas características permitem a persistência deste patógeno nos ambientes hospitalares (HARDING et al., 2013; GAYOSO et al., 2014; AL ATROUNI et al., 2016; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

2.7.1 Biofilme

O biofilme consiste em comunidades bacterianas, aderidas a superfícies abiótica ou biótica, envoltas por uma matriz exopolissacarídea produzida pelas bactérias. A formação do biofilme contribui para a colonização de pacientes e dispositivos médicos, e atua como barreira contra a ação de agentes antimicrobianos e desinfetantes, fornece proteção à dessecação, além de facilitar à evasão do sistema imunológico. Assim, sua formação dificulta o tratamento e contribui para a persistência do patógeno no ambiente hospitalar, bem como no hospedeiro humano, sendo responsável por infecções crônicas (SHIN; PARK, 2017; EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; ASIF; ALVI; REHMAN, 2018). As etapas de formação e maturação do biofilme podem ser influenciadas por fatores como: pilus Csu tipo I, sistema de dois componentes BfmRS e GacSA, proteínas de membrana externa (OmpA, Bap e Pmt), sistemas de efluxo (AdeABC, AdeIJK, AdeFGH), toxinas RTX, produção de poli-beta-1,6-N-acetilglucosamina (PNAG), polissacarídeos capsulares, entre outros. Dentre estes, a proteína associada ao biofilme Bap (*biofilm-associated protein*), secretada pelo sistema de secreção do tipo I, consiste em uma proteína de superfície que participa do processo de formação e maturação do biofilme. Atua no processo de adesão à

superfícies abióticas, como poliestireno e titânio, além de desempenhar um papel importante na estrutura tridimensional do biofilme e na formação de canais de água (VIEIRA; PICOLI, 2015; SHIN; PARK, 2017; EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018; ASIF; ALVI; REHMAN, 2018; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

2.7.2 Motilidade em *Acinetobacter* spp.

Apesar de ser considerado um microrganismo imóvel, o *Acinetobacter* pode apresentar dois tipos de motilidade independente de flagelo denominadas: motilidade associada à superfície e motilidade do tipo *twitching*, que foram descritas em *A. baumannii* e *A. nosocomialis*. Esta característica pode proporcionar vantagem em diferentes sítios anatômicos, onde segundo estudos foi observada maior motilidade em isolados provenientes de sangue em relação a isolados obtidos de escarro. A motilidade associada à superfície em meio semissólido, também conhecida como motilidade de espalhamento, consiste em um processo multifatorial e complexo influenciado pelo crescimento bacteriano e facilitado pela produção de surfactantes. Esta motilidade pode ser regulada por condições extracelulares, como alta concentração salina, baixos níveis férricos, uso de antimicrobianos e exposição à álcool (McQUEARY et al., 2012; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). A motilidade do tipo *twitching*, também conhecida como motilidade de contração, é mediada pelo pili do tipo IV que após fixação em uma superfície, se retrai, promovendo a translocação da célula em direção ao ponto de fixação. Além de atuar na motilidade bacteriana, este pili participa de processos como a transformação natural e a adesão à superfícies biótica e abiótica (McQUEARY et al., 2012; HARDING et al., 2013; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

2.7.3 Polissacarídeos Capsulares e Lipooligossacarídeos

A presença de cápsula é considerada um dos principais fatores de virulência em *Acinetobacter*, que confere proteção ao patógeno contra ameaças externas, como a entrada de antimicrobianos macromoleculares e a evasão do sistema imunológico do hospedeiro, regulado pelo sistema de dois componentes

BfmRS (SHIN; PARK, 2017; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; SKERNIŠKYTĖ et al., 2019).

Os lipooligossacarídeos (LOS), macromoléculas constituídas por um oligossacarídeo central e lipídeo A, presentes na membrana externa bacteriana, atuam como agentes quimiotáticos recrutando células inflamatórias. Estudos têm relatado associação da resistência às polimixinas à modificações no LOS, devido adição de fosfoetanolamina ou galactosamina ao lipídeo A, bem como à perda completa desta estrutura. Estão relacionados também a resistência à antimicrobianos hidrofóbicos, como as quinolonas, mediada pela alteração da permeabilidade da membrana a estes fármacos (CAG et al., 2016; SHIN; PARK, 2017; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; SKERNIŠKYTĖ et al., 2019).

2.7.4 Sistemas de Aquisição de Metais

Os sistemas de aquisição de metais, tais como ferro e zinco, também são considerados fatores de virulência, por se tratarem de moléculas fundamentais para a manutenção dos processos biológicos destes microrganismos. As moléculas responsáveis pela captação destes metais são denominadas sideróforos, sendo as mais importantes a acinetobactina (ferro) e a calprotectina (zinco e manganês). Além dos sideróforos, a aquisição de metais pode ser mediada por sistemas de efluxo como o ZnuABC, que é hiperexpresso em condições de limitação de zinco (LEE et al., 2017; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

2.7.5 Sistemas de Secreção de Proteínas

Os sistemas de secreção de proteínas são responsáveis pela secreção de uma ampla gama de proteínas efetoras que são essenciais para a interação do microrganismo com o ambiente e o hospedeiro. Foram descritos em *A. baumannii* os sistemas de secreção do tipo I (SST1), tipo II (SST2), tipo IV (SST4), tipo V (SST5) e tipo VI (SST6), os quais apresentam diferentes graus de contribuição para a virulência deste patógeno (WEBER et al., 2017; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). A proteína de membrana trimérica Ata foi o primeiro sistema de secreção identificado em *A. baumannii*, pertencente ao SST5, conhecido como

sistema autotransportador, e está relacionada com a formação e manutenção do biofilme, bem como com a adesão a componentes da matriz extracelular/membrana basal, como o colágeno tipo I, II, III, IV, V e laminina. O SST6 é um importante sistema responsável por promover a morte de outras espécies bacterianas, por meio da injeção de toxinas letais na bactéria competidora, bem como contribui para a disseminação da resistência aos antimicrobianos. O SST2, por sua vez, é responsável pela secreção de um grande número de proteínas efetoras, como a LipA e a CpaA que apresentam, respectivamente, atividade de lipase e capacidade de degradar fibrinogênio e fator V da cascata de coagulação, impedindo a formação de coágulos, além de atuar na mediação da colonização do pulmão e na disseminação do microrganismo para outros órgãos. O SST1 é responsável pela secreção de Bap e da proteína RTX. O SST4, por sua vez, medeia a transferência horizontal de genes e, portanto, desempenha um importante papel na transferência de genes de resistência aos antimicrobianos e na plasticidade genômica (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; WEBER et al., 2017; LEE et al., 2017; ELHOSSEINY, ATTIA, 2018).

2.7.6 Vesículas de Membrana Externa

As OMVs (*outer membrane vesicles*) são vesículas encontradas em espécies de bactérias Gram-negativas, que podem conter variadas proteínas citoplasmáticas, como toxinas, fatores de virulência e proteínas imunomoduladoras, que não são secretadas pelos sistemas de secreção convencionais. As OMVs são formadas por meio de um processo denominado de vesiculação, onde ocorre o abaulamento da membrana externa bacteriana, seguido por constrição, resultando na liberação destas vesículas. Estas vesículas podem ser transferidas para outras bactérias fornecendo à célula hospedeira fatores de virulência como OmpA, proteases e fosfolipases, além de mediar a transferência horizontal de genes codificadores de carbapenemases extracelulares (*bla_{OXA-58}*) ou inseridos em plasmídeos inteiros (*bla_{OXA-24}* e *bla_{NDM-1}*), conferindo resistência aos antimicrobianos. Estas estruturas podem se fundir à membrana externa da célula alvo, resultando na transferência do seu conteúdo intercelular mediada pelo pili do tipo IV e demais

proteínas associadas a competência bacteriana (FULSUNDAR et al., 2014; LEE et al., 2017; ELHOSSEINY, ATTIA, 2018).

2.7.7 Proteínas de Membrana Externa

As proteínas de membrana externa (OMPs) apresentam papéis importantes na patogênese e adaptação nas células hospedeiras, bem como na resistência à antimicrobianos. Consiste em proteínas que atravessam as membranas celulares e atuam como poros pelos quais ocorre a passagem de moléculas, como nutrientes, toxinas e antimicrobianos. A OmpA, também chamada de Omp38, é uma das principais proteínas liberadas por OMVs, e consiste na maior e mais abundante porina presente na membrana externa de *A. baumannii*. Esta porina é necessária para uma variedade de atividades associadas à infecção, atuando na biogênese das OMVs, adesão na formação de biofilme e citotoxicidade. A Omp33-36, por sua vez, esta associada à citotoxicidade, induz apoptose, modula a autofagia, promove a persistência intracelular nas células humanas, além de resistência aos antimicrobianos. Outras porinas identificadas em *A. baumannii* que desempenham papel na patogênese deste patógeno são Omp22, CarO e OprD-like (SHIN; PARK, 2017; LEE et al., 2017; WEBER et al, 2017; ELHOSSEINY, ATTIA, 2018; GALLAGHER et al., 2015).

2.7.8 Quorum Sensing

O *quorum sensing* consiste no mecanismo utilizado pelas bactérias para comunicação inter e intra-espécies por meio de moléculas autoindutoras de sinalização, como a lactona de acil homoserina (AHL), com o objetivo de coordenar a regulação dos sistemas fisiológicos, bem como a expressão gênica, de acordo com as mudanças no ambiente (JUNG; WOOJUN, 2015; ASIF; ALVI; REHMAN, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os determinantes de resistência aos antimicrobianos e fatores de virulência de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. recuperados de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Londrina (HU) no período de janeiro de 2006 à março de 2018.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar dados clínicos de pacientes que apresentaram infecções causadas por isolados de *Acinetobacter* spp. selecionados para este estudo;
- Confirmar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos;
- Estabelecer a classificação de resistência dos isolados;
- Investigar 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*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{GES}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrVc*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF* and *rmtG*) e de virulência (*bap*) por PCR multiplex e *single*;
- Analisar o contexto genético dos isolados carreadores dos genes *bla*_{OXA-23-like} e *bla*_{OXA-58-like};
- Investigar a presença de clones epidêmicos mundiais em isolados de *A. baumannii*;
- Avaliar fenotipicamente a produção de carbapenemases dos isolados carreadores do gene *bla*_{OXA-58};
- Determinar a similaridade genética entre os isolados portadores de *bla*_{OXA-58};
- Avaliar a capacidade de produção de biofilme dos isolados portadores de *bla*_{OXA-58};

- Determinar a concentração inibitória mínima aos antimicrobianos: imipenem, meropenem, polimixina B, colistina, ceftazidima e tigeciclina em isolados portadores de *bla*_{OXA-58};
- Sequenciar o genoma total do isolado Ac 374/14 carreador do gene *bla*_{OXA-58}.
- Detectar e caracterizar determinantes de resistência e de virulência do isolado Ac 374/14 por meio de ferramentas de bioinformática.

4 ARTIGO A

Antimicrobial resistance and distribution of OXA-carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* recovered of respiratory material in the period of ten years

Larissa dos Santos Fávaro¹, Floristher Elaine Carrara-Marroni^{1*}

¹Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência aos Antimicrobianos, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Patológicas, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina – Pr, Brazil.

* Corresponding author.

Current Address: Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência aos Antimicrobianos. Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid – PR445 Km 179. Campus Universitário. CEP 86051-990. Londrina, Paraná, Brasil. Phone: +55 43 3371-5726. E-mail: floristher@uel.br

Abstract

In this study, a total of 282 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates recovered of respiratory material of inpatients in the intensive care units (ICU) of the HU between the years 2006 and 2016 were characterized. Identification of the isolates was performed by conventional biochemical methods, automated systems and amplification of the *bla*_{OXA-51} gene. Most isolates were considered multidrug-resistant (MDR) (76.3%) and high antimicrobial resistance rates were verified, including carbapenems, drugs of choice for the treatment of infections caused by *A. baumannii* MDR. The high rate of resistance to carbapenems (100.0%) is attributed to the prevalence of the gene encoding the carbapenemase OXA-23 (93.6%), being the *bla*_{OXA-23-like} gene mostly associated with Tn2008 (92.8%), followed by Tn2006. In addition, the variant *bla*_{OXA-253} was detected in one isolate (0.4%). A polyclonal profile was observed among the isolates, which belonged to the international clonal complexes CC113/79, CC110/25 and CC103/15. These data justify the maintenance and dissemination of the *bla*_{OXA-23} gene among the isolates of *A. baumannii* in this institution.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; Carbapenem resistance; CHDL; Clonal complex.

Text

Acinetobacter baumannii is an important nosocomial pathogen, responsible for a wide range cause of nosocomial and community-acquired infections, as well as being associated with high mortality rates and present a substantially higher incidence in intensive care units (ICU) (LEE et al., 2017; SILVA et al., 2018). Part of the success of *A. baumannii* in the hospital environment can be directly attributed to its genomic plasticity, which allows it to adapt rapidly when subjected to conditions of adversity and stress, and its capacity to accumulate and spread antimicrobial resistance determinants (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

Currently, the high levels of antimicrobial resistance, as well as the high rates of *Acinetobacter* isolates resistant to most of the antimicrobials available in clinical practice, have made the treatment of infections caused by these

microorganisms a great challenge, due the limiting of therapeutic options (LIN; LAN, 2014). Carbapenems are considered antimicrobial of choice in the treatment of infections caused by *Acinetobacter* MDR. In the last decade, the increase of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAb) together with the ability of this microorganism to acquire resistance determinants culminated in the increase of MDR isolates in the worldwide (LEE et al., 2017; TIAN et al., 2018; SILVA et al. al., 2018). Among resistance mechanisms, the production of carbapenemases of the type Carbapenem-Hydrolyzing class D beta-Lactamases (CHDLs) is the main cause of antimicrobial resistance, of which the OXA-23, OXA-24, OXA-58 and OXA-143 are main and most widely acquired CHDLs spread in *Acinetobacter* species (ELHOSSEINY; ATTIA, 2018; CASTILHO et al., 2017).

In this study, we established the resistance profile to the main antimicrobials used in clinical practice and investigated the presence of beta-lactamases and acquired resistance genes to colistin and quinolones. In addition, we characterized the genetic context of the CHDL genes and detected the presence of international clonal complexes of *A. baumannii* clinical isolates non-susceptible to ceftazidime, imipenem and/or meropenem, recovered from tracheal aspirate ($\geq 10^6$ CFU/mL) of inpatients attended in intensive care units (ICUs) of the Hospital Universitário de Londrina (HU), Brazil between January 2006 and December 2016.

According to the criteria established were included in this study a total of 282 clinical isolates of which two isolates were recovered in 2010, 39 in 2011, 42 in 2012, 14 in 2013, 28 in 2014, 60 in 2015 and 97 in 2016. The samples were collected mostly in the Adult ICU (77.7%), burned ICU (19.8%), pediatric ICU (2.1%) and neonatal ICU (0.4%), respectively. The highest rates of isolation of *A. baumannii* in tracheal aspirate were observed in male patients (63.8%), with a median age of 55 years, ranging from newborn to 97 years-old, and the clinical outcome that resulted in mortality was observed in most patients (72.3%) (Table 1) which is similar to other reports (ROYER et al., 2015; NEVES et al., 2016; CASTILHO et al., 2017; ROMANIN, 2018; SILVA et al., 2018).

All isolates were identified by conventional biochemical methods and Vitek2 automated system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and confirmed as *A. baumannii* by amplification of the *bla*_{OXA-51-like} gene (TURTON et al., 2006). Antimicrobial susceptibility testing was performed by the disk diffusion method and

Vitek2 automated system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The antimicrobial agents tested were amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), levofloxacin (5 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (25 µg), tetracycline (30 µg), tigecycline (15 µg), piperacillin-tazobactam (100/10 µg), ampicillin-sulbactam (10/10 µg), ceftriaxone (30 µg), cefotaxim (30 µg), ceftazidime (30 µg), cefepime (30 µg), polymyxin B (300 U), colistin (10 µg), imipenem (10 µg) and meropenem (10 µg) (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). According to the guidelines for *Acinetobacter* spp. established by Magiorakos and colleagues (2011) the isolates were classified as multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) and pandrug-resistant (PDR). High levels of resistance were observed for the carbapenems (100.0%), fluoroquinolones (98.8 to 100.0%), cephalosporins (100.0%), beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination (85.9 to 100.0%) and aminoglycosides (56.5 to 67.6%) (Table 2). These high resistance rates were also observed in other Brazilian studies (CORTIVO et al., 2015; SILVA et al., 2018). However, previous studies revealed, in comparison to our study, lower rates of carbapenem resistance (NEVES et al., 2016; CASTILHO et al., 2017; ROMANIN, 2018). In Brazil, another studies presented high susceptibility rates to polymyxins and/or tigecycline, similar to that observed in our study (CASTILHO et al., 2017; SILVA et al., 2018), supporting the possible utilization of these agents in the treatment of carbapenem-resistant *A. baumannii* infections in our institution. According to some studies that had shown the prevalence of MDR isolates, the most of our isolates were classified as MDR (76.3%) and 23.0% of the isolates were XDR (Table 3) (ROYER et al., 2015; CASTILHO et al., 2017). Surprisingly, another study performed in the same period in our institution with *A. baumannii* recovered from blood samples presented the predominance of XDR isolates (ROMANIN, 2018).

The presence of beta-lactamases-encoding genes (WOODFORD et al., 2006; HIGGINS et al., 2010; DOYLE et al., 2012; MENDES et al., 2007), and determinants of acquired resistance to colistin (LIU et al., 2016) and quinolones (KRAYCHETE et al., 2016) were investigated by PCR using specific primers. Previous studies in our institution demonstrated the *bla*_{OXA-23-like} gene as an endemic gene in *A. baumannii*, and it could be confirmed once, that for the acquired CHDLs genes, the most of the *A. baumannii* isolates harbored the *bla*_{OXA-23-like} gene (93.6%) and one the

*bla*_{OXA-143-like} (0.4%), whose sequencing analysis identified the *bla*_{OXA-253} variant (Table 3). In Brazil, the carbapenem resistance is high and is mainly associated with the *bla*_{OXA-23}-producing isolates, as observed in our study (ROYER et al., 2018; BRASILIENSE et al., 2019). Similar results were seen in studies from *A. baumannii* isolates recovered of ICUs of hospitals in Santa Catarina, Minas Gerais and Paraná states that reported the detection of this gene in 87.3% (CORTIVO et al., 2015), 100.0% (ROYER et al., 2015) and 97.9% (ROMANIN, 2018) of the isolates analyzed, respectively. Although reports of the high prevalence of *bla*_{OXA-23-like}, some studies developed in Minas Gerais, Goiás and Paraná states reported lower detection rates of this gene with rates around to 51.2%-60.0% (NEVES et al., 2016; CASTILHO et al., 2017; MOREIRA et al., 2018).

The genetic context of the isolates harboring the *bla*_{OXA-23-like} gene was investigated for the occurrence of Tn2006, Tn2007, Tn2008 and Tn2009 using PCR amplification strategies previously described (CHEN et al., 2017), and different amplicon sizes were sequenced to confirm the genetic context. The presence of two different transposons was detected, the Tn2008 found in 92.8% of the isolates was the most prevalent, while the Tn2006 was detected in 6.4% (Table 3). Two isolates were not positive for Tn2006, Tn2007, Tn2008 and Tn2009. The high prevalence of the Tn2008 shows the successful adaptation of this mobile element in this institution. However, other study developed in the HU reported higher prevalence of the Tn2006 (86.0%) in *A. baumannii* isolates recovered from bloodstream (ROMANIN, 2018). Both these transposons are characterized by the IS*Aba1* upstream the *bla*_{OXA-23} gene and many Brazilian studies have reported this structure, which highlight that the presence of the IS*Aba1* upstream of the gene lead to an increase of the CHDL gene expression and consequently the decrease of carbapenem susceptibility. In addition, some reports attributes the dissemination of the *bla*_{OXA-23} with the presence of this structure (CASTILHO et al., 2017; ROYER et al., 2018; AZEVEDO et al., 2019).

The carbapenem resistance among *A. baumannii* isolates has increased dramatically in the last years due to the emergence and dissemination of specific epidemic clones. Furthermore, these so-called international clones have been associated with the enhanced rates of MDR *A. baumannii* infections in worldwide. The presence of international clonal complexes commonly detected in Brazil, CC113/79, CC109/1, CC110/25, CC103/15 and CC118/2, was investigated

using a multiplex PCR described by Martins et al. (2016). A total of 189 (67.0%) isolates belonging to the international clonal complexes CC113/79 (n=90), CC110/25 (n=73) and CC103/15 (n=26) were identified (Table 3). Similar frequencies were observed in several Brazilian studies, nonetheless the CC109/1 was not identified in our study (ROYER et al., 2018; SILVA et al., 2018; AZEVEDO et al., 2019; PAGANO et al., 2018; ROMANIN, 2018). In Brazil, the CC113/79 is mainly related to *A. baumannii* OXA-23-producing isolates and is considered a high risk clone in ICUs (SILVA et al., 2018; AZEVEDO et al., 2019). The Brazilian endemic clonal complexes are CC109/1, CC103/15, CC110/25 and CC113/79, which play an important role in the dissemination CHDL genes in carbapenem-resistant *A. baumannii*, mainly the *bla*_{OXA-23-like} gene (VASCONCELLOS et al., 2017; SILVA et al., 2018). In our study, the isolates carrying the *bla*_{OXA-23} gene belonged to several clonal complexes, consequently, we can infer that the dissemination of this resistance determinant and the increase of carbapenem-resistant *A. baumannii* is not related to a specific clone (PAGANO et al. al., 2018). In addition, the *bla*_{OXA-253}-harboring isolate belonged to the CC110/25 such as observed in a previous study (CAVALCANTI et al., 2016).

In summary, our results demonstrated a high incidence of resistance to the main classes of antimicrobial agents, including to carbapenems, as well as MDR and XDR strains among the isolates analyzed. The *bla*_{OXA-23-like} gene was extensively distributed in the isolates evaluated, which were majority inserted in mobile genetic elements (Tn2008 and Tn2006) and belonged to endemic international clonal complexes in Brazil. This may have contributed to the increasing incidence of carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates in our institution. Few antimicrobial agents showed effective, emphasizing the importance of monitoring bacterial antimicrobial resistance in the HU to understand the dynamics of nosocomial infections and to guide the implementation of measures for the prevention and control to prevent dissemination of resistance determinants, which is as an emerging problem that needs be prioritized and causes great concern in the world public health.

Funding

This work was supported by grants from Programa de Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde (PPSUS)/Fundação Araucária/SESA-PR/MS/CNPq, and Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação (PROPPG) of the Universidade Estadual de Londrina (UEL). This work was part of the M.Sc. dissertation of L. S. Fávaro.

Competing interests

None declared

Ethics

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

References

- AL ATROUNI, A. et al. Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-12, 2016.
- AZEVEDO, F. K. S. F. et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in two hospitals in Central Brazil: the role of ST730 and ST162 in clinical outcomes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, p. 31-40, 2019.
- BRASILIENSE, D. M. et al. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter pittii* carrying the *bla_{OXA-72}* gene in the Amazon region, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 93, n.1, p. 82-84, 2019.
- 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**, v. 12, n. 5, p. 1-13, 2017.
- 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. et al. Spread of the *bla_{OXA-23}*-containing Tn2008 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates grouped in CC92 from China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, a. 163, p. 1 -6, 2017.

- CORTIVO, G. D. et al. Antimicrobial resistance profiles and oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in Santa Catarina, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 699-705, 2015.
- DOYLE, D. et al. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877-3880, 2012.
- ELHOSSEINY, N. M.; ATTIA, A. S. *Acinetobacter*: an emerging pathogen with a versatile secreto-me. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 33, p. 1-15, 2018.
- HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, p. 91-102, 2018.
- 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.
- KRAYCHETE, G. B. et al. 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.
- LEE, C.R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, a. 55, p. 1 -35, 2017.
- LIN, M. F.; LAN, C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World Journal of Clinical Cases**, v. 2, n. 12, p. 787-814, 2014.
- 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.
- 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.

- MARTINS, N. et al. A new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clones. **Infection, Genetics, and Evolution**, v. 42, p. 41-45, 2016.
- MENDES, R. E. et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time pcr assay and melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 544-547, 2007.
- MOREIRA, R. R. B. et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* OXA-23 in old and new intensive care units without transfer of colonized patients. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, p. 1135-1137, 2018.
- 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.
- PAGANO, M. et al. Comparative Analysis of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Sequence Types in Southern Brazil: From the First Outbreak (2007–2008) to the Endemic Period (2013–2014), 2018. **Microbial Drug Resistance**, v. 0, n. 0, p. 1-5, 2018.
- ROMANIN, P. **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 páginas. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.
- ROYER, S. et al. Spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 350-357, 2015.
- ROYER, S. et al. Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial *bla*_{OXA-23} producing XDR *Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**, p. 1-14, 2018.
- SILVA, K. E. et al. A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit. **PLoS One**, p. 1-11, 2018.
- TAKIZAWA, E. et al. An Intrinsic Strain of Colistin-resistant *Acinetobacter* Isolated from a Japanese Patient. **Internal Medicine**, v. 55, p. 2301-2306, 2016.

TIAN, J. et al. Five novel carbapenem-hydrolysing OXA-type b-lactamase groups are intrinsic in *Acinetobacter* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. 3279-3284, 2018.

TURTON, J. F. et al. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *Fems Microbiology Letters*, v. 258, n. 1, p. 72-77, 2006.

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.

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.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients with infection caused by *Acinetobacter baumannii* isolated from tracheal aspirate.

| Clinical characteristics | Frequency n (%) |
|---------------------------------|----------------------------|
| Gender | |
| Male | 180 (63.8) |
| Female | 102 (36.2) |
| Age | |
| 0-20 years | 24 (8.5) |
| 21-40 years | 62 (22.0) |
| 41-60 years | 86 (30.5) |
| ≥61 years | 110 (39.0) |
| Patient location | |
| Adult ICU | 219 (77.7) |
| Burned ICU | 56 (19.8) |
| Pediatric ICU | 6 (2.1) |
| Neonatal ICU | 1 (0.4) |
| Patient outcome | |
| Discharged | 75 (26.6) |
| Death | 204 (72.3) |
| Other | 3 (1.1) |

ICU, intensive care unit.

Table 2. Antimicrobial susceptibility profile of *Acinetobacter baumannii* isolated from tracheal aspirate.

| Antimicrobials | Total | Susceptible n (%) | Non-susceptible n (%) |
|---|--------------|--------------------------|------------------------------|
| Aminoglycosides | | | |
| Amikacin | 278 | 121 (43.5) | 157 (56.5) |
| Gentamicin | 278 | 90 (32.4) | 188 (67.6) |
| Carbapenems | | | |
| Imipenem | 281 | - | 281 (100.0) |
| Meropenem | 280 | - | 280 (100.0) |
| Fluroquinolones | | | |
| Ciprofloxacin | 268 | - | 268 (100.0) |
| Levofloxacin | 248 | 3 (1.2) | 245 (98.8) |
| Cephalosporins | | | |
| Cefepime | 279 | - | 279 (100.0) |
| Cefotaxim | 280 | - | 280 (100.0) |
| Ceftriaxone | 52 | - | 52 (100.0) |
| Ceftazidime | 279 | - | 279 (100.0) |
| Tetracyclines | | | |
| Tetracycline | 77 | 50 (64.9) | 27 (35.1) |
| Glycylcylines | | | |
| Tigecycline | 182 | 159 (87.4) | 23 (12.6) |
| beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination | | | |
| Ampicillin-sulbactam | 276 | 6 (2.2) | 270 (97.8) |
| Sulfamethoxazole-trimethoprim | 276 | 39 (14.1) | 237 (85.9) |
| Piperacillin-tazobactam | 72 | - | 72 (100.0) |
| Lipopeptides (Polymyxins) | | | |
| Colistin | 206 | 190 (92.2) | 16 (7.8) |
| Polymyxin B | 45 | 36 (80.0) | 9 (20.0) |

Table 3. Antimicrobial susceptibility profile and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolated from tracheal aspirate.

| | Frequency n (%) |
|--|--------------------|
| Resistance profile | |
| MDR | 215 (76.3) |
| XDR | 65 (23.0) |
| Genes found | |
| <i>bla</i> _{OXA-51} | 282 (100.0) |
| <i>bla</i> _{OXA-23} | 264 (93.6) |
| <i>bla</i> _{OXA-143} | 1 (0.4) |
| Genetic context of <i>bla</i>_{OXA-23} gene | |
| Tn2006 | 17 (6.4) |
| Tn2008 | 245 (92.8) |
| Other | 2 (0.8) |
| Clonal complexes | |
| CC103/15 | 26 (9.2) |
| CC110/25 | 73 (25.9) |
| CC 113/79 | 90 (31.9) |
| Other | 93 (33.0) |

MDR, multidrug-resistant; XDR, extensively drug-resistant, Tn, transposon; CC, clonal complex.

5 ARTIGO B

First report of an *Acinetobacter bereziniae* isolate carrying the *bla*_{OXA-58} in Brazil

Larissa dos Santos Fávaro¹, Floristher Elaine Carrara Marroni^{1*}

¹Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência aos Antimicrobianos, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Patológicas, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina – Pr, Brazil.

* Corresponding author.

Current Address: Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência aos Antimicrobianos. Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid – PR445 Km 179. Campus Universitário. CEP 86051-990. Londrina, Paraná, Brasil. Phone: +55 43 3371-5726. E-mail: floristher@uel.br.

Abstract

In this study we report the description of the first isolate of *Acinetobacter bereziniae* carrying of the *bla*_{OXA-58} gene detected in Brazil. By sequencing the total genome of isolate Ac 374/14 was verified that this isolate, MDR and strong biofilm producer, presents 13 antimicrobial resistance genes including determinants of resistance to beta-lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones, phenicols and sulfonamide. In addition, this isolate presents several efflux systems and virulence genes. By means of *in silico* analyzes the genetic context of the *bla*_{OXA-58} gene was characterized, demonstrating that this gene is flanked on either sides by the IS*Aba*3 insertion sequence, with IS*Aba*3 interrupted by the IS*Aba*125 upstream of the *bla*_{OXA-58} gene. This study revealed a new determinant of resistance to carbapenems in HU, so it is necessary to take control measures to prevent the spread of this gene.

Key words: *Acinetobacter bereziniae*; Carbapenem resistance; CHDL; OXA-58.

Text

Acinetobacter species are microorganisms isolated from different ecological niches, including the hospital settings, where the members of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex are the more common nosocomial pathogens. Currently, several cases concerning multidrug-resistant (MDR) in non-*baumannii* *Acinetobacters* causing infections in health-care facilities have been reported worldwide which have lead to an enhanced of clinical importance of these isolates harboring important resistance determinants. The *Acinetobacter* genospecies 10 was initially described by Bouvet and Grimont in 1986 and later named *Acinetobacter bereziniae* by Nemeč in 2010. This specie has been presently considered one emerging human pathogen causing infections in health care-associated settings, but also found in the environment including vegetable samples (NEMEC et al, 2010; GROSSO et al, 2015). Recent reports have detected *A. bereziniae* as reservoir of important encoding resistance genes to several antimicrobial classes as aminoglycosides (*aphA6*, *aacA4*, *aacA7*, *aacC1*, *aadA1*), chloranphenicol (*catB8*), sulfonamide (*suII*), beta-lactams (*bla*_{OXA-2}, *bla*_{OXA-4}, *bla*_{OXA-300}, *bla*_{OXA-301}, *ampC*) and even to carbapenems (*bla*_{SIM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IIMP-1}, *bla*_{IIMP-5}, *bla*_{IIMP-19}, *bla*_{NDM-1}) (SUNG et al., 2014; YAMAMOTO et al, 2013; GROSSO et al, 2015; BROVEDAN et al, 2016).

Carbapenems are recognized as drugs of choice for the treatment of infections caused by MDR *Acinetobacter* spp. However, the increased use of these antimicrobials resulted in the emergence of resistance and it limited the therapeutic options significantly. The carbapenem resistance in *Acinetobacter* spp. occurs mainly due to the production of carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamases (CHDLs) of which the main acquired and most widely CHDLs spread in *Acinetobacter* spp. are OXA-23, OXA-24, OXA-58 and OXA-143 (CASTILHO et al, 2017). The *bla*_{OXA-58} gene was first detected in 2003 in a carbapenem-resistant *A. baumannii* isolate recovered from a nosocomial outbreak in France, and since has been isolated worldwide. In addition to *A. baumannii*, this gene was detected in other species of the genus *Acinetobacter* (*A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. junii*, *A. townneri*, *A. seifertii*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. bereziniae*, *A. calcoaceticus*, *A. radioresistens*, *A. guillouiae*, *A. haemolyticus*) and, in rare occasions, was described in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Proteus mirabilis* suggesting the horizontal gene transfer. In Brazil, this gene was only found in *A. baumannii* and *A. seifertii* (EVANS; AMYES, 2014; CAYÔ et al, 2016; CASTILHO et al, 2017; GIRLICH et al, 2017). Curiously, in the literature there are reports of *A. bereziniae* isolates carrying the *bla*_{OXA-58} gene recovered only in Ireland and Portugal, however there are no details about the genetic context of this gene in this specie (BOO; CROWLEY, 2009; GROSSO et al, 2015). Therefore, here we report the first detection of the *bla*_{OXA-58} gene in an *A. bereziniae* clinical isolate of a tertiary Brazilian hospital.

The isolate Ac 374/14 was recovered from a quantitative endotracheal aspirate (QEA) culture (10^6 UFC/mL) in August 2014 of an 83-year-old female patient diagnosed with ventilator-associated pneumonia (VAP). The patient was suffering of cerebral ischemic stroke and was admitted to the tertiary teaching hospital located in the city of Londrina, Paraná state, Southern Brazil, eighteen days prior to the isolation of Ac 374/14. The antimicrobial therapy consisted of intravenous ceftriaxone (1g, twice daily) and intravenous azithromycin (500mg, once daily) by 10 days and was initiated fifteen days before the detection of the isolate. Subsequently, the intravenous piperacillin sodium/tazobactam sodium (4,5g, four times a day) was included in the therapy five days before the isolate have been recovered. After the isolate detection, the patient received treatment with colistin (150mg, twice daily), tigecycline (50mg, twice daily) and levofloxacin (500mg, every two days). However,

despite all the efforts including the broad-spectrum antimicrobial therapy, the clinical conditions worsed and the patient presented refractory septic shock (pulmonary focus) and died. The Ac 374/14 was initially identified as *Acinetobacter* spp. according to conventional biochemical tests, morphological and growth characteristics, and was originally identified as *Acinetobacter lwoffii* by the Vitek2 automated system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The molecular identification was performed by the *rpoB* gene sequencing and revealed 100% nucleotide identity with *A. bereziniae* type strain NIPH 1050 (GenBank accession number FJ754436.1).

Antimicrobial susceptibility testing was performed by disk-diffusion and microdilution method, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012; CLSI, 2018). The minimal inhibitory concentration (MIC) breakpoints for *Enterobacteriaceae* were applied to interpret tigecycline. The isolate showed the MDR profile, with resistance to carbapenems (16 and 8 µg/mL for imipenem and meropenem, respectively), extended-spectrum cephalosporins (≥64 µg/mL for ceftriaxone and cefepime), aminoglycoside (≥16 µg/mL for gentamicin), and fluoroquinolones (≥4 µg/mL for ciprofloxacin), but susceptible only to ampicillin-sulbactam (8 µg/mL), polymyxins (1 µg/mL to colistin and polymyxins B) and tigecycline (≤0.125 µg/mL).

For *Acinetobacter* spp., *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria* spp. and *Streptococcus pneumoniae* the MIC values imply that infections with these organisms might be treated with tigecycline but the clinical evidence is currently limited and the organisms not within the approved indications.

The carbapenemase production of this isolate was evaluated by the CarbAcineto NP test and the multiplex PCR amplification analysis revealed that Ac 374/14 had a *bla*_{OXA-58-like} gene but was negative for other CHDL and MBL genes (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24/40-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-143-like}, *bla*_{OXA-253}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{GIM-1} and *bla*_{NDM}). Sequencing established 100% identity with known *bla*_{OXA-58} sequences (GenBank accession no: CP028560.1/*Acinetobacter* sp; CP028573.1/ *A. pittii*).

The genome sequencing of *A. bereziniae* Ac 374/14 was performed using the Illumina MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) using a 300-bp paired-end library, which generated 4,663,604 reads. After sequencing, those reads were subjected to trimming and filtering using the CLC Genomics Workbench

software (version 11.0.1), in which reads with an average Phred quality of less than 30 and with one or more ambiguities were removed. Finally, reads with a size less than 50 bp, as well as the last 10 nucleotides of the 3' end of each read, were removed. After the trimming, 4,660,646 reads were used in the assembly, which generated a genome coverage corresponding to ~233-fold, based on the reference genome size of 4,509,124 bp for *A. bereziniae* strain XH901 (NZ_CP018259.1). The genome of 374/14 was assembled using CLC Genomics Workbench software (version 11.0.1) and a total of 242 contigs were generated, comprising a total length of 4,837,458, with coverage depth of 160, N50 value of 45,186, maximum length of 154,002 bp, minimum length of 579 bp and G+C content of 38.1%. Annotation of the draft assembly was performed using the Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) v.2.0 (available from rast.nmpdr.org/) which included 4572 coding genes and 77 RNA genes.

The acquired antimicrobial resistance genes and plasmid replicons were identified using the ResFinder 3.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) and PlasmidFinder 1.3 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>), respectively, available from the Center for Genomic Epidemiology. No plasmid was found in this database and the resistome analysis revealed the presence of beta-lactams resistance genes (*bla*_{OXA-257}, *bla*_{CARB-49}) including the *bla*_{OXA-58} that confer resistance to carbapenems. In addition, aminoglycoside resistance genes [aph(3')-Vla, ant(2'')-Ia], phenicol resistance genes (*floR*) and sulphonamide resistance gene (*sulII*). Furthermore, according to the RAST, were observed point mutations in the *parC*, *parE*, *gyrA* and *gyrB* genes and the presence of the *bla*_{MCA} and *ampC* genes, responsible for fluoroquinolone and the intrinsic beta-lactams resistance, respectively. In addition, four efflux pumps families [resistance–nodulation cell–division (RND); major facilitator superfamily (MFS) and multidrug and toxic compound extrusion (MATE), ABC superfamily efflux transport system] were identified in whole-genome sequencing *in silico* analysis.

Additionally, the genetic context of the *bla*_{OXA-58} gene was described based on the *in silico* analysis and the isolate harbored an IS*Aba*125–ΔIS*Aba*3–*bla*_{OXA-58}–IS*Aba*3–*bla*_{MCA}–*ampC* genetic structure (Figure 1). The *bla*_{OXA-58} gene was found to be flanked on either side by and IS*Aba*3 insertion sequence. However, the upstream region of the *bla*_{OXA-58} gene was very similar to originally identified in

Acinetobacter genospecies 3 by Evans and colleagues (2010) which demonstrated the IS*Aba3* interrupted by the IS*Aba125*.

A cluster of genes associated with colicin E (*crbC*-like, *creB*, *creC* and *creD*), colicin V and bacteriocin production (*dedA*, *dedE*, R1, R3, R4, R5, R8 and *purF*) and other genes associated with invasion and intercellular resistance, including active virulence operons involved in protein synthesis (rv0682, rv0683, rv0684, rv0685, rv1641, rv1642, and rv1643), DNA transcription (rv0667 and rv0668), quinolinate biosynthesis (rv1594, rv1595, and rv1596), and internalin-like protein were found. In addition the presence of the *ompA* could be associated with the phenotypic characteristic of a strong biofilm producer of this isolate.

In summary, to our knowledge, this is the first study reporting the isolation of an OXA-58-producing *A. bereziniae* in Brazil, a clinical isolate endowed with antimicrobial resistance and virulence encoding genes which are responsible by the MDR resistance profile and the ability of biofilm production of the Ac 374/14. In addition, the genetic context of this carbapenem resistant clinical isolate was characterized. In the recent years, non-*baumannii* *Acinetobacter* species, as *A. bereziniae*, have demonstrated resistance to carbapenems which have lead to an increased importance and prevalence of nosocomial infections caused by these isolates. Therefore, the detection of this isolate in our institution is worrisome once this isolate can act as reservoir of the *bla*_{OXA-58} gene and could spread this gene to species of major clinical importance in HU, such as the troublesome and endemic pathogen *A. baumannii*.

The complete genome sequence of *A. bereziniae* Ac 374/14 have been deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under accession number NZ_QWFFV01000066. The version described in this paper is the first version, NZ_QWFFV01000066.1.

Funding

This work was supported by grants from Programa de Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde (PPSUS)/Fundação Araucária/SESA-PR/MS/CNPq, and Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação (PROPPG) of the Universidade Estadual de Londrina (UEL). This work was part of the M.Sc. dissertation of L. S. Fávoro.

Competing interests

None declared

Ethical approval

Not required

References

- BROVEDAN, M. et al. Draft Genome Sequence of *Acinetobacter bereziniae* HPC229, a Carbapenem-Resistant Clinical Strain from Argentina Harboring *bla*_{NDM-1}. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, 2016.
- BOO, T. W.; CROWLEY, B. Detection of *bla*_{OXA-58} and *bla*_{OXA-23-like} genes in carbapenem-susceptible *Acinetobacter* clinical isolates: should we be concerned? **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 839-841, 2009.
- BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwofii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 228-240, 1986.
- 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**, v. 12, n. 5, p. 1-13, 2017.
- CAYÔ, R et al. Old Clinical isolates of *Acinetobacter seifertii* in Brazil Producing OXA-58. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2589-2591, 2016.
- 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. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – twenty-eighth edition, M100-S28. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 38, n. 3, Wayne, PA: CLSI; 2018.
- EVANS B. A. et al. Novel genetic context of multiple *bla*_{OXA-58} genes in *Acinetobacter* *genospecies* 3. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1586-1588, 2010.

- EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA beta-Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 241-263, 2014.
- GIRLICH D et al. Chromosomal Amplification of the *bla*_{OXA-58} Carbapenemase Gene in a *Proteus mirabilis* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 2, 2017.
- GROSSO F. et al. Extending the reservoir of *bla*_{IMP-5}: the emerging pathogen *Acinetobacter bereziniae*. **Future Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 1609-1613, 2015.
- NEMEC, A. et al. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 896-903, 2010.
- SUNG, J. Y. et al. Epidemiological Characterizations of Class 1 Integrons from Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Isolates in Daejeon, Korea. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 34, n. 4, p. 293-299, 2014.
- YAMAMOTO, M. et al. Regional dissemination of *Acinetobacter* species harbouring metallo-beta-lactamase genes in Japan. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 8, p. 729-736, 2013.

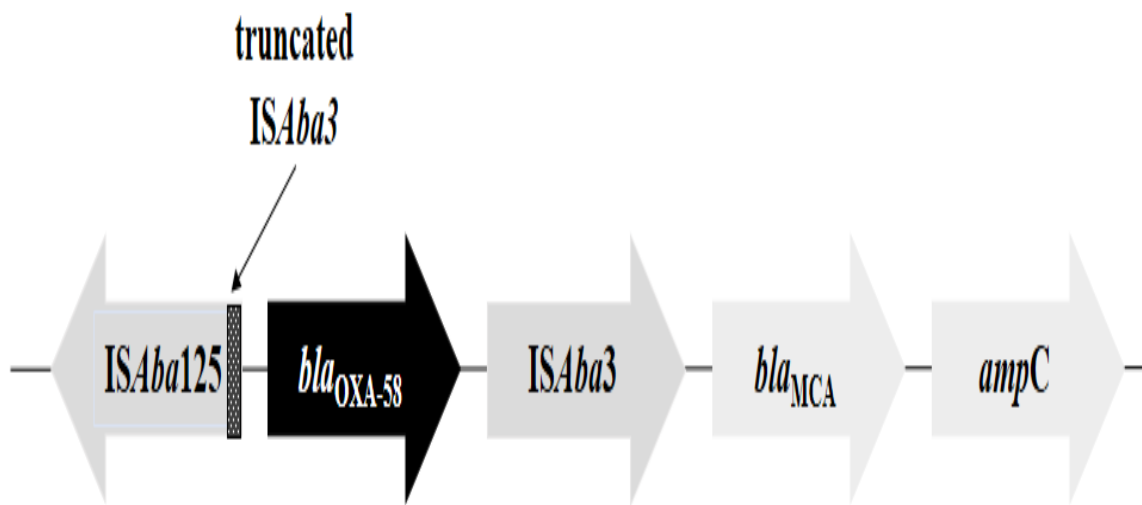


Figure 1. Genetic context of the *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter bereziniae* Ac 374/14.

6 ARTIGO C

Occurrence of OXA-58 in non-*baumannii* *Acinetobacter* clinical isolates from Brazil

Larissa dos Santos Fávaro¹, Floristher Elaine Carrara- Marroni^{1,*}

¹Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência aos Antimicrobianos, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Patológicas, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina – Pr, Brazil.

* Corresponding author.

Current Address: Laboratório de Estudos Moleculares e Resistência aos Antimicrobianos. Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid – PR445 Km 179. Campus Universitário. CEP 86051-990. Londrina, Paraná, Brasil. Phone: +55 43 3371-5726. E-mail: floristher@uel.br

Abstract

The aim of this study was to identify the presence of carbapenemases-encoding genes in non-*baumannii* *Acinetobacter* species isolated in a Brazilian hospital. Fourteen isolates of *Acinetobacter* spp. recovered of the HU between 2006 and 2018 were studied. According to the *rpoB* gene sequencing analysis, was identified seven isolates of *Acinetobacter bereziniae*, two of *A. haemolyticus*, two of *A. ursingii*, and one from each species *A. radioresistens*, *A. colistiniresistens* and *Acinetobacter* sp. Six isolates, five *A. bereziniae* and one *A. colistiniresistens*, harbored the *bla*_{OXA-58} and was considered biofilm producers, and the isolate identified as *A. radioresistens* presented the *bla*_{OXA-23} gene. ERIC-PCR analysis of *bla*_{OXA-58} harborer isolates showed that three isolates of *A. bereziniae* were clonally related, of which two were identical, whereas three isolates belonged to individual clusters. This study highlights the need for correct identification of *Acinetobacter* species and the implementation of appropriate hospital infection control measures to prevent the spread of resistance determinants like the *bla*_{OXA-58} gene among other relevant hospital pathogens.

Key words: *Acinetobacter* spp.; Carbapenem resistance; CHDL; OXA-58.

Text

In the last years, carbapenem resistance in *Acinetobacter* spp. has been described principally in *Acinetobacter baumannii*. Nonetheless, other species has been shown as important nosocomial pathogens and has presented elevated levels of antimicrobial resistance (AL ATROUNI et al., 2016). Currently, the amplification and analysis of the *rpoB* gene sequence has been considered the gold standard methodology for the identification of *Acinetobacter* spp (TAKIZAWA et al., 2016). Consequently, the incapacity to accurately differentiate *Acinetobacter* spp. at the specie level by phenotypic tests used in clinical laboratories had lead to an underestimation of the actual prevalence of resistance to carbapenems in non-*baumannii* *Acinetobacter* species. Carbapenem resistance in the *Acinetobacter* spp. has been attributed mainly by the production of carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamases (CHDL) (CASTILHO et al., 2017). Here we described the occurrence of two non-*baumannii* *Acinetobacter* species harboring the *bla*_{OXA-58}, a CHDL-encoding gene, isolated from a tertiary teaching hospital in Brazil.

In a local surveillance study, fourteen non-*baumannii* *Acinetobacter* isolates were recovered from different patients hospitalized in a tertiary teaching hospital located in the city of Londrina, Brazil between November 2006 and March 2018. These isolates were collected from the tracheal aspirate (n=3), blood (n=3), urine (n=2), tissue (n=2), wound secretion (n=2), ulcer secretion (n=1) and bone fragment (n=1) (Table 1). These isolates were initially identified as *Acinetobacter lwoffii* (Ac 51, Ac 374/14, Ac 521/14, Ac 571/14, Ac 505/15, Ac 236/15, Ac 531/15, Ac 644/15, Ac 38/18), *Acinetobacter haemolyticus* (Ac 110, Ac 400/16), *Acinetobacter ursingii* (Ac 238/15, Ac 160/18) and *Acinetobacter* spp. (Ac 317) by automated systems. The *rpoB* gene sequence analysis identified the isolates as *Acinetobacter bereziniae* (n=7), *Acinetobacter haemolyticus* (n=2), *Acinetobacter ursingii* (n=2), *Acinetobacter radioresistens* (n=1), *Acinetobacter colistiniresistens* (n=1) and *Acinetobacter* sp. (n=1) (Table 1) (LA SCOLA et al., 2006).

The presence of beta-lactamases-encoding genes, acquired resistance determinants to colistin, quinolones and aminoglycosides were investigated by PCR followed by sequencing using specific primers (WOODFORD et al., 2006; HIGGINS et al., 2010; DOYLE et al., 2012; MENDES et al., 2007; WANG et al., 2006; LABORATÓRIO ALERTA; REBELO et al., 2018; KRAYCHETE et al., 2016; HIDALGO et al., 2013; BUENO et al., 2013). Five isolates identified as *A. bereziniae* harbored the *bla_{OXA-58}* gene and one of these isolates also harbored the *bla_{TEM}*. In addition, one isolate identified as *A. colistiniresistens* presented the *bla_{OXA-58}* gene and the *bla_{OXA-23}* was detected in an isolate identified as *A. radioresistens*, being this intrinsic gene the species (Table 1). The genetic context of the *bla_{OXA-58}* gene was characterized as previously described (VILLALÓN et al., 2013), and was identified the IS_{Aba3} insertion sequence (IS) downstream of the *bla_{OXA-58}* in five isolates which one isolate also presented the IS_{Aba1} upstream of the *bla_{OXA-58}*. Only one isolate not presented the IS investigated (Table 2).

The virulence determinant *bap* was investigated by PCR according to Kodori et al. (2017) and the capacity to form biofilm was evaluated in a 96-well microtiter plate assay according protocol described by Merritt et al. (2015) with some modifications. The biofilm formation was observed in all isolates with the most of the isolates considered strong biofilm producers and no isolates were positive for the presence of the *bap* gene (Table 2).

The clonal relatedness of the six *bla*_{OXA-58}-harboring isolates was determined by ERIC-PCR (SILBERT et al., 2004) and revealed the presence of four different profiles. The analysis showed that three isolates were considered to be clonally related, being of these two isolates identical, whereas three isolates belonged to individual clusters. The five *A. bereziniae* isolates were included in the clusters II, III and IV and the *A. colistiniresistens* that showed the great diversity was included in the cluster I (Figure 1).

Minimal inhibitory concentrations (MICs) determination by broth microdilution were performed according to guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012; CLSI, 2018) and the breakpoints for Enterobacteriaceae were applied to interpret tigecycline. As shown in Table 2, it was observed that the three isolates belonging to individual clusters (I, II, III) demonstrated the multidrug-resistant profile (MAGIORAKOS et al., 2012). The isolates belonging to clusters II and III were resistant to carbapenems (8.0 and 4.0 µg/mL for meropenem and 16.0 µg/mL for imipenem, respectively) and ceftazidime (32.0 and 16.0 µg/mL), and the cluster II isolate was also resistant to polymyxins (8.0 µg/mL for colistin and 4.0 µg/mL for polymyxin B). The isolate from cluster I was susceptible to most antimicrobials, however, it presented a high MIC for polymyxins (≥32.0 µg/mL for colistin and 32.0 µg/mL for polymyxin B), due to an intrinsic characteristic of this specie described in the literature (NEMEC et al., 2017). From cluster IV, one isolate was resistant to ceftazidime (16.0 µg/mL), two to polymyxin B (4.0 µg/mL) and all were resistant to colistin (4.0 to 8.0 µg/mL). The *bla*_{OXA-58}-harboring isolates were susceptible to tigecycline (≤0.125 to 0.5 µg/mL).

Since its first report in *Acinetobacter baumannii* isolated in France, the *bla*_{OXA-58} has been described worldwide and in other species of *Acinetobacter*, as well as some Enterobacteriaceae such as *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, and *Proteus mirabilis* (POIREL et al., 2005; EVANS; AMYES, 2014; GIRLICH et al., 2017). In Brazil, there are few reports of *Acinetobacter* species harboring the *bla*_{OXA-58} gene which has been reported until the date only in *A. baumannii* and *A. seifertii* (CAYÔ et al., 2016; CASTILHO et al., 2017). Here we described the first reports of the *bla*_{OXA-58} gene in *A. bereziniae* and *A. colistiniresistens* isolates in Brazil.

The *bla*_{OXA-58}-harboring isolates included in this study were recovered in our institution in 2014 and 2015, and the genetic contexts of *bla*_{OXA-58} identified presented different antibiotics resistance profiles (FU et al., 2014). The isolate 374/14 presented the IS*Aba3* interrupted by the IS*Aba125* and the isolate 644/15 presented the IS*Aba1* upstream of the *bla*_{OXA-58}, a similar context to that identified in other studies that included isolates with reduced susceptibility to carbapenems (GUSATTI et al., 2012; EVANS et al., 2010). Curiously, in this study the isolates that not presented IS upstream of *bla*_{OXA-58} were susceptible to carbapenems, while isolates presenting IS were resistant. Therefore, the presence of IS upstream of the *bla*_{OXA-58} gene may be associated with the increased gene expression and consequent reduction of susceptibility observed to carbapenems. In addition, the presence of *bla*_{OXA-58} in three *A. bereziniae* isolates susceptible to carbapenems emphasizes the threat of these isolates as reservoirs of genes encoding carbapenemases not detected, which may allow the persistence and dissemination of these genes for other species. This occur because the investigation of the genes and implementation of hospital infection control measures are generally performed in isolates that present phenotypic resistance in the antimicrobial susceptibility test. Furthermore, the presence of carbapenemase-encoding genes in non-*baumannii* *Acinetobacter* that have decreased susceptibility to polymyxins represent an great concern for public health, because it notoriously limits the available therapeutic options for treatment this infections.

Despite non-*baumannii* *Acinetobacter* are commonly susceptible to several antimicrobials, the possibility of the additional insertion of IS that act as promoter of the *bla*_{OXA-58} gene, as well as acquiring mobile genetic elements harboring resistance determinants must be taken into account. In summary, this study underscores the need for correct identification of *Acinetobacter* species and the implementation of adequate hospital infection control measures to avoid dissemination of resistance determinants among relevants hospital pathogens.

Funding

This work was supported by grants from Programa de Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde (PPSUS)/Fundação Araucária/SESA-PR/MS/CNPq, and Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação (PROPPG) of the Universidade Estadual de Londrina (UEL). This work was part of the M.Sc. dissertation of L. S. Fávaro.

Competing interests

None declared

References

- AL ATROUNI, A. et al. Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-12, 2016.
- BUENO, M. F. C. et al. Coproduction of 16S rRNA Methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M Group Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2397-2400, 2013.
- 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**, v. 12, n. 5, p. 1-13, 2017.
- CAYÔ, R et al. Old Clinical isolates of *Acinetobacter seifertii* in Brazil Producing OXA-58. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2589-2591, 2016.
- 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. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – twenty-eighth edition, M100-S28. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 38, n. 3, Wayne, PA: CLSI; 2018.
- DOYLE, D. et al. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877-3880, 2012.

- EVANS, B. A.; AMYES, S. G.B. OXA β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 241-263, 2014.
- EVANS B. A. et al. Novel genetic context of multiple *bla*_{OXA-58} genes in *Acinetobacter* genospecies 3. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1586-1588, 2010.
- FU , Y. et al. Characterization of a Novel Plasmid Type and Various Genetic Contexts of *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter* spp. from Multiple Cities in China. **PLoS One**, v. 9, n.1, p. 1-6, 2014.
- GIONCO, B. et al. Detection of OXA-231, a new variant of *bla*_{OXA-143}, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 67, p. 2531-2532, 2012.
- GIRLICH D et al. Chromosomal Amplification of the *bla*_{OXA-58} Carbapenemase Gene in a *Proteus mirabilis* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 2, 2017.
- 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.
- HIDALGO, L. et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 1543-1550, 2013.
- 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.
- KODORI, M. et al. The impact of primer sets on detection of the gene encoding biofilm-associated protein (Bap) in *Acinetobacter baumannii*: *in silico* and *in vitro* analysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 304-308, 2017.
- KRAYCHETE, G. B. et al. 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.
- LA SCOLA, B. et al. Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 827-832, 2006.

REBELO, A. R. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. **Eurosurveillance**, p. 1-11, 2018.

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.

MENDES, R. E. et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time pcr assay and melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 544-547, 2007.

MERRITT, J. H.; KADOURI, D. E.; O'TOOLE, G. A. Growing and analyzing static biofilms. **Current Protocols in Microbiology**, 2005.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter colistiniresistens* sp. nov. (formerly genomic species 13 sensu Bouvet and Jeanjean and genomic species 14 sensu Tjernberg and Ursing), isolated from human infections and characterized by intrinsic resistance to polymyxins. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 2134-2141, 2017.

POIREL, L. et al. OXA-58, a Novel Class D beta-Lactamase Involved in Resistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 202-208, 2005.

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.

TAKIZAWA, E. et al. An Intrinsic Strain of Colistin-resistant *Acinetobacter* Isolated from a Japanese Patient. **Internal Medicine**, v. 55, p. 2301-2306, 2016.

VILLALÓN, P. et al. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo-b-lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 550-553, 2013.

WANG, C. et al. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum-beta-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1261-1262, 2006.

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.

Table 1. Demographic data of patients, clinical characteristics, identification and characterization of non-*baumannii* *Acinetobacter* isolates.

| Isolate Ac | Date of isolation | Source | CFU/mL | Patient location | Patient outcome | Identification | | | Resistance profile | C |
|------------|-------------------|-------------------|-----------------|------------------|-----------------|--------------------------|------------------------------|-----------------|--|----|
| | | | | | | Vitek2® | RpoB | Acession number | | |
| 51 | 11/13/2006 | Urine | 10 ⁷ | AMB | Discharged | <i>A. Iwoffii</i> | <i>A. radioresistens</i> | CP027365.1 | - | bl |
| 110 | 01/23/2008 | Ulcer | - | PED | Discharged | <i>A. haemolyticus</i> | <i>A. haemolyticus</i> | CP030880.1 | AK | - |
| 317 | 05/31/2011 | Wound secretion | - | EXT | Discharged | <i>Acinetobacter</i> sp. | <i>Acinetobacter</i> sp. | JF495490.1 | - | - |
| 374/14 | 08/16/2014 | Tracheal aspirate | 10 ⁶ | ER | Death | <i>A. Iwoffii</i> | <i>A. bereziniae</i> | FJ754436.1 | AK, CN, LEV, CIP, IPM, MEM, FEP, CAZ, SXT, TZP | bl |
| 521/14 | 10/24/2014 | Blood | - | ID | Discharged | <i>A. Iwoffii</i> | <i>A. bereziniae</i> | KR107539.1 | LEV, CIP, STX | - |
| 571/14 | 11/14/2014 | Tissue | - | MW | Death | <i>A. Iwoffii</i> | <i>A. bereziniae</i> | PO18259.1 | CIP | bl |
| 505/15 | 05/19/2015 | Blood | - | ID | Discharged | <i>A. Iwoffii</i> | <i>A. colistiniresistens</i> | KX014585.1 | AK, SXT | bl |
| 236/15 | 07/12/2015 | Blood | - | MW | Death | <i>A. Iwoffii</i> | <i>A. bereziniae</i> | PO18259.1 | CIP | bl |
| 238/15 | 07/19/2015 | Wound secretion | - | MW | Discharged | <i>A. ursingii</i> | <i>A. ursingii</i> | AP018824.1 | - | - |
| 644/15 | 10/15/2015 | Tracheal aspirate | 10 ⁶ | ICU | Death | <i>A. Iwoffii</i> | <i>A. bereziniae</i> | FJ754436.1 | AK, CN, LEV, CIP, IPM, MEM, FEP, CAZ, SXT, TZP | bl |
| 531/15 | 11/16/2015 | Tracheal aspirate | 10 ⁵ | ER | Discharged | <i>A. Iwoffii</i> | <i>A. bereziniae</i> | PO18259.1 | CIP | bl |
| 400/16 | 07/16/2016 | Bone fragmente | - | AMB | Discharged | <i>A. haemolyticus</i> | <i>A. haemolyticus</i> | CP018871.1 | FEP, SAM | - |
| 38/18 | 01/12/2018 | Tissue | - | MW | Discharged | <i>A. Iwoffii</i> | <i>A. bereziniae</i> | PO18259.1 | AK, LEV, CIP, SXT | - |
| 160/18 | 03/15/2018 | Urine | 10 ⁵ | ER | Discharged | <i>A. ursingii</i> | <i>A. ursingii</i> | KU961646.1 | - | - |

AMB, ambulatory; PED, pediatrics; EXT, external; ER, emergency room; ID, infectious diseases; MW, male ward; ICU, intensive care unit; AK, amikacin; CN, gentamicin; LEV, levofloxacin; CIP, ciprofloxacin; IPM, imipenem; MEM, meropenem; FEP, cefepime; CAZ, ceftazidime; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim; TZP, piperacillin-tazobactam, SAM, ampicillin-sulbactam.

Table 2. Antimicrobial susceptibility profile, genetic similarity, genetic context and biofilm production of *Acinetobacter bereziniae* and *Acinetobacter colistiniresistens* isolates harboring *bla*_{OXA-58} gene.

| Isolate Ac | Species | ERIC | Resistance profile | | | | | | | Genetic context of <i>bla</i> _{OXA-58} gene | <i>bap</i> gene | Biofilm |
|------------|------------------------------|------|--------------------|-------|-------|------|--------|-------|------|---|-----------------|---------|
| | | | MIC (µg/mL) | | | | | | | | | |
| | | | MEM | IPM | CAZ | TGC | COL | PMB | | | | |
| 374/14 | <i>A. bereziniae</i> | III | MDR | 4,0 | 16,0 | 16,0 | ≤0,125 | 1,0 | 1,0 | ISAba125-ΔISAba3- <i>bla</i> _{OXA-58} -ISAba3* | ND | Strong |
| 571/14 | <i>A. bereziniae</i> | IV | NC | ≤0,25 | ≤0,25 | 16,0 | ≤0,125 | 8,0 | 4,0 | <i>bla</i> _{OXA-58} -ISAba3 | ND | Strong |
| 505/15 | <i>A. colistiniresistens</i> | I | MDR | 1 | 0,5 | 8,0 | ≤0,125 | ≥32,0 | 32,0 | - | ND | Weak |
| 236/15 | <i>A. bereziniae</i> | IV | NC | ≤0,25 | 0,5 | 8,0 | ≤0,125 | 4,0 | 1,0 | <i>bla</i> _{OXA-58} -ISAba3 | ND | Strong |
| 644/15 | <i>A. bereziniae</i> | II | MDR | 8,0 | 16,0 | 32,0 | 0,5 | 8,0 | 4,0 | ISAba1- <i>bla</i> _{OXA-58} -ISAba3 | ND | Weak |
| 531/15 | <i>A. bereziniae</i> | IV | NC | ≤0,25 | 0,5 | 2,0 | ≤0,125 | 8,0 | 4,0 | <i>bla</i> _{OXA-58} -ISAba3 | ND | Strong |

* Unpublished study data.

NC, not classified; ND, not detected; MDR, multidrug-resistant; MIC, Minimal inhibitory concentration; MEM, meropenem; IPM, imipenem; CAZ, ceftazidime; TGC, tigecycline; COL, colistin; PMB, polymyxin B.

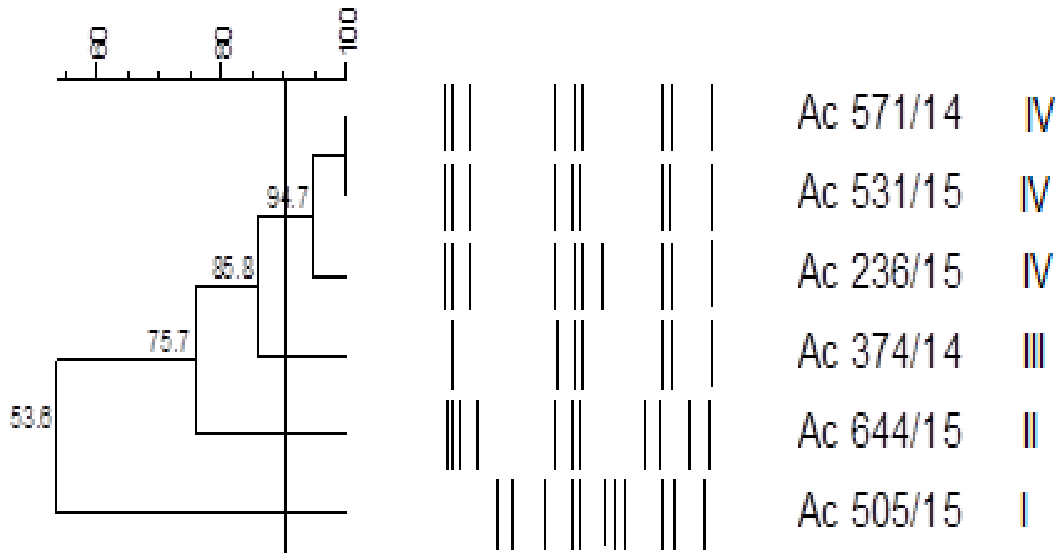


Figure 1. Dendrogram based on ERIC-PCR of *Acinetobacter bereziniae* and *Acinetobacter colistiniresistens* isolates harboring *bla_{OXA-58}* gene.

7 CONCLUSÃO

- Quanto aos isolados de *A. baumannii*, os dados clínicos obtidos do período avaliado confirmam este patógeno como um importante causador de infecções respiratórias nas UTIs do HU, principalmente em pacientes do sexo masculino e com idade avançada.
- As taxas elevadas de não sensibilidade às principais classes de antimicrobianos utilizados na terapia e predomínio de isolados de *A. baumannii* MR e ER observados reforçam a dificuldade de tratamento de infecções causadas por este patógeno.
- As altas taxas de resistência aos carbapenêmicos podem ser atribuídas à prevalência do gene codificador da carbapenemase adquirida OXA-23 associado, em sua maioria, aos Tn2008 e Tn2006, que, em conjunto com a detecção de um perfil policlonal e amplamente pertencentes aos complexos clonais internacionais, sugerem e justificam a manutenção e disseminação deste determinante de resistência entre os isolados de *A. baumannii* no HU.
- Em relação aos isolados de *Acinetobacter* não-*baumannii*, foi possível confirmar a dificuldade de identificação dos isolados ao nível de espécie por metodologias fenotípicas manuais e/ou automatizadas utilizadas no Laboratório de Microbiologia Clínica desta instituição.
- Foram verificados isolados de *Acinetobacter* não-*baumannii* portadores de importantes determinantes de resistência, principalmente aos carbapenêmicos como *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-23} evidenciando a presença de um novo gene codificador de resistência a esta importante classe de antimicrobianos utilizada como fármacos de escolha no tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp no HU.
- A presença de isolados de *A. bereziniae* e *A. colistiniresistens* portadores do gene *bla*_{OXA-58} e produtores de biofilme reforça a

importância clínica destas espécies como responsáveis por infecções hospitalares e sobretudo como reservatórios deste determinante de resistência. Além disso, isolados sensíveis aos carbapenêmicos portadores do gene *bla*_{OXA-58} ressaltam a dificuldade na detecção deste determinante de resistência uma vez que estudos moleculares para a detecção de genes codificadores de CHDL geralmente são realizados em isolados que apresentam resistência aos carbapenêmicos. Este fato reforça a necessidade de atenção da equipe de controle de infecção hospitalar do HU em relação à vigilância epidemiológica a fim de evitar a disseminação deste gene para espécies mais virulentas presentes no ambiente hospitalar como *A. baumannii*.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADEWOYIN, M. A.; OKOH, A. I. The natural environment as a reservoir of pathogenic and non-pathogenic *Acinetobacter* species. **Reviews on Environmental Health**, p. 1-8, 2018.
- AL ATROUNI, A. et al. Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-12, 2016.
- ALMASAUDI, S. B. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 3, p. 586-596, 2018.
- ANTONIO, C. S. 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.
- ASIF, M.; ALVI, I. A.; REHMAN, S. U. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1249-1260, 2018.
- AZEVEDO, F. K. S. F. et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in two hospitals in Central Brazil: the role of ST730 and ST162 in clinical outcomes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, p. 31-40, 2019.
- BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R. Y. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 5, p. 1520-1541, 1968.
- BÉRÉZIN, E. B.; FRIEDMAN, H.; BENDINELI, M. *Acinetobacter*. Biology and Pathogenesis. **Springer Science & Business Media**, 2008.
- BOGAERTS, P. et al. GES Extended-Spectrum β -Lactamases in *Acinetobacter baumannii* Isolates in Belgium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4872-4878, 2010.
- BONNIN, R. A. et al. Biochemical and Genetic Characterization of Carbapenem-Hydrolyzing beta-Lactamase OXA-229 from *Acinetobacter bereziniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3923-3927, 2012.
- BONNIN, R. A. et al. Carbapenem-Hydrolyzing GES-Type Extended-Spectrum beta-Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 349-354, 2011.
- BONNIN, R. A. et al. Carbapenem resistance in a human clinical isolate identified to be closely related to *Acinetobacter indicus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 4, p. 345-350, 2014.

- BOU, G.; OLIVER, A.; BELTRAN, J. M. OXA-24, a Novel Class D β -Lactamase with Carbapenemase Activity in an *Acinetobacter baumannii* Clinical Strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1556-1561, 2000.
- BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 28-240, 1986.
- BOUVET, P. J. M.; JEANJEAN, S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. **Research in Microbiology**, v. 140, p. 291-299, 1989.
- BRADY, A. C.; LEWIS, J. S.; PFEIFFER, C. D. Rapid detection of *bla*_{OXA} in carbapenem-susceptible *Acinetobacter radioresistens* bacteremia leading to unnecessary antimicrobial administration. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 4, p. 488-489, 2016.
- BRISOU, J.; PRÉVOT, A. R. Études de systématique bacterienne. X. Revision des espèces réunies dans le genre *Achromobacter*. **Institute Pasteur**, v. 86, p. 722-728, 1954.
- BROEK, P. J. et al. Endemic and Epidemic *Acinetobacter* Species in a University Hospital: an 8-Year Survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3593-3599, 2009.
- BROVEDAN, M. et al. Draft Genome Sequence of *Acinetobacter bereziniae* HPC229, a Carbapenem-Resistant Clinical Strain from Argentina Harboring *bla*_{NDM-1}. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, 2016.
- BROWN, S.; YOUNG, H. K.; AMYES, G. B. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 1, 2005.
- CAG, Y. et al. Resistance mechanisms. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 17, 2016.
- CARVALHO, A. A. et al. Characterization and molecular epidemiology of extensively prevalent nosocomial isolates of drug-resistant *Acinetobacter* spp. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 1-11, 2016.
- 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**, v. 12, n. 5, p. 1-13, 2017.
- 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, p. 250-251, 2013.

- 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, 2017.
- CAYÔ, R. et al. Identification of a New Integron Harboring *bla*_{IMP-10} in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3687-3689, 2015.
- CAYÔ, R. et al. Occurrence of IMP-1 in non-*baumannii* *Acinetobacter* clinical isolates from Brazil. **Journal Medical of Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 628-630, 2018.
- CAYÔ, R et al. Old Clinical isolates of *Acinetobacter seifertii* in Brazil Producing OXA-58. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2589-2591, 2016.
- CHAGAS, T. P. G. et al. Detection of an NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* strain in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, p. 147-148, 2015.
- CHATTERJEE, S. et al. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* and Other *Acinetobacter* spp. Causing Neonatal Sepsis: Focus on NDM-1 and Its Linkage to IS*Aba125*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1126, 2016.
- CHAVDA, B. et al. Coidentification of *mcr-4.3* and *bla*_{NDM-1} in a Clinical *Enterobacter cloacae* Isolate from China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, 2018.
- CHEN, T. L. et al. *Acinetobacter baylyi* as a pathogen for opportunistic infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 2938-2944, 2008.
- CHEN, Y. et al. Spread of the *bla*_{OXA-23}-containing Tn2008 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates grouped in CC92 from China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, a. 163, p. 1 -6, 2017.
- CHIU, C. H. et al. A retrospective study of the incidence, clinical characteristics, identification, and antimicrobial susceptibility of bacteremic isolates of *Acinetobacter ursingii*. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 400, 2015.
- CODJOE, F. S.; DONKOR, E. S. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Scienses**, v. 6, n. 1, p. 1-28, 2018.
- CORTIVO, G. D. et al. Antimicrobial resistance profiles and oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in Santa Catarina, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 699-705, 2015.
- CORVEC, S. et al. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1530-1533, 2007.

COYNE, S.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 947-953, 2011.

CRAY, J. A. et al. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds?. **Microbial Biotechnology**, v. 6, p. 453-492, 2013.

DALLA-COSTA, L. M. et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3403-3406, 2003.

DENG, Y. et al. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.14, n. 45, p. 1-11, 2015.

DEXTER, C. et al. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 14, n. 5, p. 567-573, 2015.

DJAHMI, N. et al. Epidemiology of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries. **BioMed Research International**, 2014.

DJORDJEVIC, Z. M.; FOLIC, M. M.; JANKOVIC, S. M. Distribution and antibiotic susceptibility of pathogens isolated from adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia in intensive care unit. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 6, p. 740-744, 2017.

DOBRZANIECKA, K. et al. Comparison of phenotypic methods for the detection of beta-lactamases MBL in strains from the Enterobacteriaceae family and non-fermentative bacilli isolated from clinical specimens. **Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia**, v. 66, n. 3-4, p. 177-184, 2014.

DÖNHÖFER, A. et al. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, n. 42, p. 16900-16905, 2012.

DUCASSE, V. O. T. et al. First case of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography bacteraemia caused by *Acinetobacter ursingii* in a patient with choledocholithiasis and cholangitis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, p. 1170-1171, 2008.

ECDC. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. **European Centre for Disease Prevention and Control**, 2015. Disponível em: <<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf>>. Acesso em: 25/04/2018.

ECDC. The bacterial challenge: time to react. **European Centre for Disease Prevention and Control**, 2009. ISBN 978-92-9193-193-4

- ELHOSSEINY, N. M; ATTIA, A. S. *Acinetobacter*: an emerging pathogen with a versatile secretome. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 33, p. 1-15, 2018.
- ENDO, S. et al. IMP-1-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter ursingii* from Japan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2533-2534, 2012.
- EVANS, B. A.; AMYES, S. G.B. OXA beta-Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 241-263, 2014.
- EZE, E. C.; CHENIA, H. Y.; ZOWALATY, M. E. E. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 2277-2299, 2018.
- FACCONE, D. et al. Multiple clones of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter ursingii* in a children hospital from Argentina. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, p. 145-149, 2019.
- FERNANDES, M. R. et al. Novel *mcr-5.3* variant in a CTX-M-8-producing *Escherichia coli* ST711 isolated from an infected horse. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 12, p. 3520-3522, 2018.
- FIGUEIREDO, D. Q. et al. First report of the blaOXA-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.
- FIGUEIREDO, S. et al. Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 9, p. 907-913, 2012.
- FRIEDRICH, A.; HARTSCH, T.; AVERHOFF, B. Natural Transformation in Mesophilic and Thermophilic Bacteria: Identification and Characterization of Novel, Closely Related Competence Genes in *Acinetobacter* sp. Strain BD413 and *Thermus thermophilus* HB27. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3140-3148, 2001.
- FULSUNDAR, S. et al. Gene Transfer Potential of Outer Membrane Vesicles of *Acinetobacter baylyi* and Effects of Stress on Vesiculation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 11, p. 3469-3483, 2014.
- GALLAGHER, L. A. et al. Resources for Genetic and Genomic Analysis of Emerging Pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 12, p. 2027-2035, 2015.
- GARCIA, L. F. et al. Relationship Between the Quorum Network (Sensing/Quenching) and Clinical Features of Pneumonia and Bacteraemia Caused by *A. baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

- GAYOSO, C. M. et al. Molecular Mechanisms Involved in the Response to Desiccation Stress and Persistence in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Proteome Research**, v. 13, p. 460-476, 2014.
- GIARDELLO, R. et al. Diversity of polymyxin resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 1, p. 37-44, 2017.
- GIONCO, B. **Estudo da epidemiologia molecular e ocorrência da produção de carbapenemases em *Acinetobacter baumannii* isolados no Hospital Universitário de Londrina**. 2012. 76 páginas. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.
- 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, p. 2531-2539, 2012.
- GIRLICH, D. et al. OXA-253, a Variant of the Carbapenem-Hydrolyzing Class D beta-Lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2976-2978, 2014.
- GROSSO F. et al. Extending the reservoir of *bla*_{IMP-5}: the emerging pathogen *Acinetobacter bereziniae*. **Future Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 1609-1613, 2015.
- GUPTA, R. et al. Epidemiology of multidrug-resistant Gram-negative pathogens isolated from ventilator-associated pneumonia in ICU patients. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 9, p. 47-50, 2017.
- 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.
- JEAN, S. S. et al. Treatment outcomes of patients with non-bacteremic pneumonia caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolates: Is there any benefit of adding tigecycline to aerosolized colistimethate sodium?. **Medicine**, v. 97, n. 39, p. 1-9, 2018.
- HALAJI, M. et al. Investigation of Class I, II, and III Integrons Among *Acinetobacter baumannii* Isolates from Hospitalized Patients in Isfahan, Iran. **Oman Medical Journal**, v. 33, n. 1, p. 37-42, 2018.
- HALL, J. P. J. et al. The evolution of plasmid stability: Are infectious transmission and compensatory evolution competing evolutionary trajectories?. **Plasmid**, v. 91, p. 90-95, 2017.
- HARDING, C. M. et al. *Acinetobacter baumannii* Strain M2 Produces Type IV Pili Which Play a Role in Natural Transformation and Twitching Motility but Not Surface-Associated Motility. **mBio**, v. 4, n. 4, p. 1-10, 2013.

HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, p. 91-102, 2018.

HENRIKSEN, S. D. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. **Bacteriology Reviews**, v. 37, n. 4, p. 522-561, 1973.

HERRMANN, M. et al. A Pseudo-Outbreak due to *Acinetobacter Species* (GIM-1) Contamination of the Pneumatic Transport System of a Large University Hospital. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 35, n. 11, p. 1364–1372, 2014.

HIGGINS, P. G. et al. OXA-143, a Novel Carbapenem-Hydrolyzing Class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5035-5038, 2009.

HIGGINS, P. G. et al. OXA-235, a novel 1 Class D Beta-Lactamase Involved in Resistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 1-22, 2013.

HIGGINS, P. G.; ZANDER, E.; SEIFERT, H. Identification of a novel insertion sequence element associated with carbapenem resistance and the development of fluoroquinolone resistance in *Acinetobacter radioresistens*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 3, p. 720-722, 2012.

HOWARD, A.; O'DONOGHUE, M.; FEENEY, A.; SLEATOR, R. D. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 243-250, 2012.

IBRAHIM, M. E. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia: risk factors, antimicrobial resistance patterns and mechanisms of carbapenem resistance. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2019.

JAIN, M. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolates causing lower respiratory infections among ICU patients. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 75-81, 2019.

JOSEPH, N. M. et al. Ventilator-associated pneumonia in a tertiary care hospital in India: incidence and risk factors. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 10, p. 771-777, 2009.

JUNE, C. M. et al. The structure of a doripenem-bound OXA-51 class D beta-lactamase variant with enhanced carbapenemase activity. **Protein Science**, v. 25, p. 2152-2163, 2016.

JUNG, J; WOOJUN, P. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 6, p. 2533-2548, 2015.

KAITANY, K. C. J. et al. Mechanistic Basis of Activity against Carbapenems, Extended-Spectrum Cephalosporins, and Aztreonam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4848-4855, 2013.

KESSIS, K. C. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the *bla*_{OXA-23} and the *bla*_{GES-11} genes in a neonatology center in Tunisia. **Microbial Pathogenesis**, v. 74, p. 20-24, 2014.

KIM, Y. et al. Clonal Change of *bla*_{SIM-1}-Carrying *Acinetobacter* spp. from 2003 to 2008 in the Hospital Where It Was Initially Discovered. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 1, 2013.

KRIZOVA, L. et al. *Acinetobacter variabilis* sp. nov. (formerly DNA group 15 sensu Tjernberg & Ursing), isolated from humans and animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 857-863, 2015.

KUO, S. C. et al. Bacteremia Due to *Acinetobacter* Genomic Species 10. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 586-590, 2010.

LAMBERT, T. et al. Characterization of *Acinetobacter haemolyticus aac(6')-I_g* gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase which modifies amikacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 10, p. 1093-1100, 1993.

LEE, C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, a. 55, p. 1-35, 2017.

LEE, K. et al. Characteristics of clinical isolates of *Acinetobacter* genomospecies 10 carrying two different metallo- β -lactamases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 259-263, 2010.

LEE, K. et al. Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 520-524, 2009.

LEE, S. Y. et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based VITEK MS system for the identification of *Acinetobacter* species from blood cultures: comparison with VITEK 2 and MicroScan systems. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 35, n. 1, p. 62-68, 2015.

LEE, S. Y. et al. Identification, Genotypic Relation, and Clinical Features of Colistin-Resistant Isolates of *Acinetobacter* Genomic Species 13BJ/14TU from Bloodstreams of Patients in a University Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 931-939, 2014.

LEE, Y. T. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant Non-*baumannii* Species of *Acinetobacter* Harboring a *bla*_{OXA-51-like} Gene That Is Intrinsic to *A. baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1124-1127, 2012.

LEE, Y.T. et al. First identification of *bla*_{OXA-51-like} in Non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. **Journal of Chemotherapy**, v. 21, n. 5, p. 514-520, 2009.

LESSEL, E. F. International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 21, n. 2, p. 213-214, 1971.

LI, H. et al. Molecular analysis of biofilms on the surface of neonatal endotracheal tubes based on 16S rRNA PCR-DGGE and species-specific PCR. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 7, p. 11075-11084, 2015.

LIMA, W. G. et al. Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: a huge public health threat. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, n. 37, p. 1009-1019, 2018.

LIN, M. F.; LAN, C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World Journal of Clinical Cases**, v. 2, n. 12, p. 787-814, 2014.

LIU, Y. 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. **Lancet Infectious Diseases**, n. 16, p. 161-168, 2016.

LUPO, A.; HAENNI, M.; MADEC, J. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 3, 2018.

LUYT, C. E. et al. Microbial cause of ICU-acquired pneumonia: hospital-acquired pneumonia versus ventilator-associated pneumonia. **Current Opinion in Critical Care**, v. 24, n. 5, p. 332-338, 2018.

MAGILL, S. S. et al. Changes in Prevalence of Health Care–Associated Infections in U.S. Hospitals. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 18, p. 1732–1744, 2018.

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.

McCANN, E. et al. Carbapenem-Nonsusceptible Gram-Negative Pathogens in ICU and Non-ICU Settings in US Hospitals in 2017: A Multicenter Study. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 5, n. 10, p. 1-7, 2018.

McQUEARY, C. N. et al. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 434-443, 2012.

MEDEIROS, M.; LINCOPAN, N. Oxacillinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 6, p. 391-405, 2013.

MENDES, R. E. et al. Codetection of *bla*_{OXA-23-Like} Gene (*bla*_{OXA-133}) and *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter radioresistens*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 843-844, 2009.

MENDES, R. E. et al. Rapid Emergence and Spread of *Acinetobacter* spp. Producing Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinases: Report from the SENTRY Program. In: 48th annual Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) and 46th annual Infectious Diseases Society of America (IDSA). Washington, DC, USA. **ICAAC/IDSA 2008**, Washington: American Society for Microbiology (ASM) and Infectious Diseases Society of America (IDSA), 2008, p. Abstract C2-3857. Disponível em: < <https://www.jmilabs.com/data/posters/ICAAC2008/C2-3857.PDF>>. Acesso em: 17 de maio de 2018.

MONTAÑA, S. et al. The Genetic Analysis of an *Acinetobacter johnsonii* Clinical Strain Evidenced the Presence of Horizontal Genetic Transfer. **PLoS One**, v. 11, n. 8, 2016.

MULVEY, M. R. et al. Characterization of a colistin-resistant *Salmonella enterica* 4,[5],12:i:- harbouring *mcr*-3.2 on a variant IncHI-2 plasmid identified in Canada. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 1673-1675, 2018.

NARCISO, A. C. et al. Detection of OXA-58-producing *Acinetobacter seifertii* recovered from black necked swan at a Zoo Lake. **Antimicrobial Agenes and Chemotherapy**, 2017.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 118-124, 2009.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 896-903, 2010.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter colistiniresistens* sp. nov. (formerly genomic species 13 *sensu* Bouvet and Jeanjean and genomic species 14 *sensu* Tjernberg and Ursing), isolated from human infections and characterized by intrinsic resistance to polymyxins. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 2134-2141, 2017.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1563-1567, 2003.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 934-942, 2015.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1891-1899, 2001.

NEMEC, A. et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 393-404, 2011.

NEMEC, A. et al. Revising the taxonomy of the *Acinetobacter lwoffii* group: The description of *Acinetobacter pseudolwoffii* sp. nov. and emended description of *Acinetobacter lwoffii*. **Systematic and Applied Microbiology**, 2018.

NEMEC, A. et al. Taxonomy of haemolytic and/or proteolytic strains of the genus *Acinetobacter* with the proposal of *Acinetobacter courvalinii* sp. nov. (genomic species 14 sensu Bouvet & Jeanjean), *Acinetobacter dispersus* sp. nov. (genomic species 17), *Acinetobacter modestus* sp. nov., *Acinetobacter proteolyticus* sp. nov. and *Acinetobacter vivianii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1673-1685, 2016.

NIGRO, S. J.; HALL, R. M. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the *oxa23* carbapenemase gene. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, p. 1135-1147, 2016.

NIGRO, S.J.; HALL, R.M. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the *oxa23* carbapenemase gene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016.

NISHIMURA, Y.; INO, T.; IIZUKA, H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from Cotton and Soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 2, p. 209-211, 1988.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infectious globally: final report and recommendations. **The Review on Antibiotic Resistance**, 2016. Disponível em: <https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf>. Acesso em: 22/04/2018.

OPAZO, A. et al. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 6, n. 4, p. 311-316, 2012.

ORTH, D. F. et al. Draft Genome Sequence of JVAP01T, the Type Strain of the Novel Species *Acinetobacter dijkshoorniae*. **Genome Announcements**, v. 5, n. 2, 2017.

PAGANO, M. et al. 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.

PAGANO, M. et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 1-2, 2015.

PAGANO, M. et al. Emergence of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* Belonging to High-Risk Clones (CC15 and CC79) in Different Brazilian States. **Infections Control & Hospital Epidemiology**, v. 38, n. 2, p. 252-254, 2017.

PAGANO, M.; MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1-8, 2016.

PALKOVA, L.; MINARIK, G.; SOLTYS, K. Draft Genome Sequencing of an *Acinetobacter ursingii* Isolate from Healthy Human Skin, Carrying Multidrug Resistance Genes. **Genome Announcements**, v. 6, n. 19, 2018.

PATON, R. et al. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 2, n. 2, p. 81–87, 1993.

PATRIDGE, S. R. et al. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1-61, 2018.

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, 2008.

PILLONETTO, M. et al. First Report of NDM-1-Producing *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 25 in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7592-7594, 2014.

POIREL, L. et al. *Acinetobacter radioresistens* as a Silent Source of Carbapenem Resistance for *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1252-1256, 2008.

POIREL, L. et al. OXA-58, a Novel Class D beta-Lactamase Involved in Resistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 202-208, 2005.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition and Expression of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Gene *bla_{OXA-58}* in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1442-1448, 2006.

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.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile beta-Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.

QUINTEIRA, S. et al. Molecular Epidemiology of Imipenem-Resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* Isolates Carrying Plasmid-Mediated OXA-40 from a Portuguese Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3465-3466, 2007.

RANI, F. M. et al. *Acinetobacter* spp. Infections in Malaysia: A Review of Antimicrobial Resistance Trends, Mechanisms and Epidemiology. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-13, 2017.

RANI, F. M. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter baumannii* and non-*baumannii* *Acinetobacter* from Terengganu, Malaysia and their carriage of carbapenemase genes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, p. 1538-1543, 2018.

REBELO, A. R. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. **Eurosurveillance**, p. 1-11, 2018.

REZAEI, A. et al. Prevalence of metallo-beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit in tertiary care hospitals. **Ann Ig**, v. 30, p. 330-336, 2018.

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**, v. 16, n. 737, p. 1-16, 2016.

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.

ROBLEDO, I. E.; AQUINO, E. E.; VÁZQUEZ, G. J. Detection of the KPC Gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-Based Nosocomial Surveillance Study in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 2968-2970, 2011.

ROMANIN, P. **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 páginas. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ROSENTHAL, V. D. et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007-2012. Device-associated module. **American Journal of Infection Control**, v. 42, n. 9, p. 942-956, 2014.

ROSENTHAL, V. D. et al. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 12, p. 1495-1504, 2016.

ROYER, S. et al. Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial *bla*_{OXA-23} producing XDR *Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**, p. 1-14, nov. 2018.

RUPPÉ, E.; WOERTHER, P. L.; BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care**, v. 5, n. 21, 2015.

SADER, H. S. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). **Diagnostics Microbiology and Infectious Diseases**, v. 78, p. 443-8, 2014.

SANTAJIT, S; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

SAVOV, E. et al. Isolation of *Acinetobacter radioresistens* from a clinical sample in Bulgaria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 4, p. 57-59, 2016.

SCAIFE, W. et al. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 36, p. 585-587, 1995.

SCHUERTZ, K. F. et al. Bacteremia and meningitis caused by OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* –molecular characterization and susceptibility testing for alternative antibiotics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49s, p. 199-204, 2018.

SHIN, B.; PARK, W. Antibiotic resistance of pathogenic *Acinetobacter* species and emerging combination therapy. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 837-849, 2017.

SILVA, G. J.; DOMINGUES, S. Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Microorganisms**, v. 4, n. 3, 2016.

SILVA, K. E. et al. A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit. **PLoS One**, p. 1-11, dec. 2018.

SKERNIŠKYTĖ, J. et al. Surface-Related Features and Virulence Among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Belonging to International Clones I and II. **Frontiers Microbiology**, 2019.

SOHRABI, N. et al. Prevalence of OXA-Type beta-Lactamases Among *Acinetobacter baumannii* Isolates from Northwest of Iran. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 4, p. 385-389, 2012.

SOLTANI, B. Molecular characteristics of multiple and extensive drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from hospitalized patients in Southwestern Iran. **Le Infezioni in Medicina: Revista Periodica di Eziologia, Epidemiologia, Diagnostica, Clinica e Terapia delle Patologie Infettive**, v. 26, n. 1, p. 67-76, 2018.

SOUZA, E. S. et al. Mortalidade e riscos associados a infecção relacionada à assistência à saúde. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 24, n. 1, p. 220-228, 2015.

SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 11, 2017.

STENZEL, W.; MANNHEIM, W. On the classification and nomenclature of some nonmotile and coccoid diplobacteria, exhibiting the properties of Achromobacteriaceae. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, v. 13, n. 4, p. 195-200, 1963.

SUNG, J. Y. et al. Epidemiological Characterizations of Class 1 Integrons from Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Isolates in Daejeon, Korea. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 34, p. 293-299, 2014.

TAKIZAWA, E. et al. An Intrinsic Strain of Colistin-resistant *Acinetobacter* Isolated from a Japanese Patient. **Internal Medicine**, v. 55, p. 2301-2306, 2016.

TIAN, J. et al. Five novel carbapenem-hydrolysing OXA-type β -lactamase groups are intrinsic in *Acinetobacter* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. 3279-3284, 2018.

TJERNBERG, I.; URSING, J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 97, p. 595-605, 1989.

TOGNIM, M. C. B. et al. Dissemination of IMP-1 Metallo-beta-Lactamase-Producing *Acinetobacter* Species in a Brazilian Teaching Hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 7, p. 742-747, 2006.

TOUCHON, M. et al. The Genomic Diversification of the Whole *Acinetobacter* Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 10, p. 2866-2882, 2014.

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**, v. 44, n. 8, p. 2974-2976, 2006.

TURTON, J. F. et al. Incidence of *Acinetobacter* Species Other than *A. baumannii* among Clinical Isolates of *Acinetobacter*: Evidence for Emerging Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1445-1449, 2010.

TURTON, J. F. et al. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **Fems Microbiology Letters**, v. 258, n. 1, p. 72-77, 2006a.

VALA, M. H. et al. Detection of class A, B and D B-lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from burn patients. **Annals of Burns and Fire Disasters**, v. 27, n. 1, p. 8-13, 2014.

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**, p. 1-4, 2015.

VIEIRA, P. B.; PICOLI, S. U. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Clinical and Epidemiological Aspects. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 18, n. 2, p. 161-168, 2016.

VISCA, P. et al. Community-acquired *Acinetobacter radioresistens* bacteremia in an HIV-positive patient. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1032-1035, 2001.

WANG, X. et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, 2018.

WEBER, B. S. et al. The secrets of *Acinetobacter* secretion. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 7, p. 532-545, 2017.

WENZLER, E.; et al. Anticipating the Unpredictable: A Review of Antimicrobial Stewardship and *Acinetobacter* Infections. **Infectious Diseases and Therapy**, p. 1-24, mar. 2017.

WEINER, L. M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 37, n. 11, p. 1288-1301, 2016.

WIELAND, K.; CHHATWAL, P.; VONBERG, R. P. Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a systematic review. **American Journal of Infection Control**, v. 46, n. 6, p. 643-648, 2018.

WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. **World Health Organization**, 2014. ISBN 978-92-4-15647-8

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. In: **World Health Organization**, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1>. Acesso em: 22/04/2018.

- WONG, D. et al. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v.30, n. 1, p. 409-447, 2017.
- YAKUT, N. et al. Bacteremia due to *Acinetobacter ursingii* in infants: Reports of two cases. **The Pan African Medical Journal**, v. 23, n. 193, 2016.
- YAMAMOTO, M. et al. Regional dissemination of *Acinetobacter* species harbouring metallo-beta-lactamase genes in Japan. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 8, p. 729-736, 2013.
- ZANDER, E. et al. Insertion sequence IS18 mediates overexpression of *bla*_{OXA-257} in a carbapenem-resistant *Acinetobacter bereziniae* isolate. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, p. 270-271, 2014.
- ZANDER, E. et al. Worldwide dissemination of acquired carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamases in *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, p. 375-377, 2014a.
- ZARRILI, R. et al. *Acinetobacter* Infections in Neonates. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 48, 2018.
- ZARRILI, R. et al. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, p. 11-19, 2013.
- ZHANG, J. et al. Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1* to *mcr-5*) in human vaginal swabs. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 143, p. 1-4, 2018.
- ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. 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.
- ZHOU, Z. et al. Clinical Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baylyi* Strain Coharboring *bla*_{SIM-1} and *bla*_{OXA-23} from China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Oligonucleotídeos utilizados para a caracterização molecular de isolados de
Acinetobacter spp.

| Oligonucleotídeos | Sequência (5' – 3') | TA ^a | Tamanho do fragmento (bp) | Referência |
|-------------------|----------------------------------|-----------------|---------------------------|------------------------|
| 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 | | | |
| 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 | | | |
| IMP F | GAATAG(A/G)(A/G)TGGCTTAA(C/T)TC | 53°C | 188 | MENDES et al., 2007 |
| IMP R | TC CCAAAC(C/T)ACTA(G/C)GTTATC | | | |
| VIM F | GTTTGGTCGCATATCGCAAC | | 382 | |
| VIM R | AATGCGCAGCACCAGGATAG | | | |
| GIM F | TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC | | 72 | |
| GIM R | CGGAACGACCATTTGAATGG | | | |
| SIM-1 F | GTACAAGGGATTGCGGCATCG | | 569 | |
| SIM-1 R | TGGCCTGTTCCCATGTGAG | | | |
| SPM-1 F | CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG | | 798 | |
| SPM-1 R | CCTTTTCCGCGACCTTGATC | | | |
| GES F | ATGCGCTTCATTCACGCAC | 55°C | 846 | WANG et al., 2006 |
| GES R | CTATTTGTCCGTGCTCAGG | | | |
| SHV F | CTTGACCGCTGGGAAACGG | 55°C | 200 | LABORATÓRIO ALERTA |
| SHV R | AGCACGGAGCGGATCAACGG | | | |
| TEM F | CCCTTATTCCCTTTYTTGCGG | | 650 | |
| TEM R | AACCAGCCAGCCWGAAGG | | | |
| CTX-M-1 e 2 F | ATGTGCAGYACCAGTAA | | 512 | |
| CTX-M-1 e 2 R | CGCTGCCGGTTTTATCSCCC | | | |
| CTX-M-8 F | AACRRCAGACGCTCTAC | | 333 | |
| CTX-M-8 R | TCGAGCCGGAASGTGTAT | | | |
| MCR-1 F | ATGCCAGTTTCTTTCGCGTG | 59°C | 502 | REBELO et al., 2018 |
| MCR-1 R | TCGGCAAATTGCGCTTTTGGC | | | |
| MCR-2 F | GATGGCGGTCTATCCTGTAT | | 379 | |
| MCR-2 R | AGGCTGACACCCCATGTCAT | | | |
| MCR-3 F | ACCAGTAAATCTGGTGGCGT | | 296 | |
| MCR-3 R | AGGACAACCTCGTCATAGCA | | | |
| MCR-4 F | TTGCAGACGCCCATGGAATA | | 207 | |
| MCR-4 R | GCCGCATGAGCTAGTATCGT | | | |
| MCR-5 F | GGACGCGACTCCCTAACTTC | | 608 | |
| MCR-5 R | ACAACCAGTACGAGAGCACG | | | |
| QnrAm F | AGAGGATTTCTCACGCCAGG | 58°C | 580 | KRAYCHETE et al., 2016 |

| | | | | |
|------------------------|-------------------------------------|------|-----|------------------------|
| QnrAm R | TGCCAGGCACAGATCTTGAC | | | |
| QnrBm F | GGMATHGAAATTCGCCACTG | | 264 | |
| QnrBm R | TTTGCYGYCCGCCAGTCGAA | | | |
| QnrCm F | GCGAATTTCCAAGGGGCAAA | | 135 | |
| QnrCm R | ACCCGTAATGTAAGCAGAGCAA | | | |
| QnrDm F | AGGTGTAGCATGTATGGAAAAGC | | 691 | |
| QnrDm R | ACATTGGGGCATTAGGCGTT | | | |
| QnrSm F | GCAAGTTCATTGAACAGGGT | | 428 | |
| QnrSm R | TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG | | | |
| QnrVCm F | GAGYTKTATGGTTTAGAYCCTCG | | 71 | |
| QnrVCm R | TGTTYCYTGYTGCCACGARCA | | | |
| RmtA F | ATGAGCTTTGACGATGCCCTA | 55°C | 756 | HIDALGO et al., 2013 |
| RmtA R | TCACTTATTCTTTTTATCATG | | | |
| RmtB F | ATGAACATCAACGATGCCCT | | 769 | |
| RmtB R | CCTTCTGATTGGCTTATCCA | | | |
| RmtC F | CGAAGAAGTAACAGCCAAAG | | 711 | |
| RmtC R | ATCCCAACATCTCTCCCCT | | | |
| RmtD F | CGGCACGCGATTGGGAAGC | | 401 | |
| RmtD R | CGGAAACGATGCGACGAT | | | |
| RmtE F | ATGAATATTGATGAAATGGTTGC | | 818 | |
| RmtE R | TGATTGATTTCTCCGTTTTTG | | | |
| RmtF F | GCGATACAGAAAACCGAAGG | | 589 | |
| RmtF R | ACCAGTCGGCATAGTGCTTT | | | |
| RmtG F | AAATACCGCGATGTGTGTCC | 55°C | 250 | BUENO et al., 2013 |
| RmtG R | ACACGGCATCTGTTTCTTCC | | | |
| F-Bap-C | ATGCCTGAGATACAAATTATTGCCAA | 56°C | 561 | KODORI et al., 2017 |
| R-Bap-C | GGATAATC AGGTGCTGAAGAATCATCATTAC | | | |
| ERIC1R | GTGAATCCCCAGGAGCTTACA | 40°C | - | SILBERT et al., 2004 |
| ERIC2 | AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG | | | |
| MCR-1 F | CGGTCAGTCCGTTTGTCTCGGCA | 54°C | 309 | LIU et al., 2016 |
| MCR-1 R | CTTGGTCCGGTCTGTAGGG | | | |
| Tn2006 Int-P3 | GTCTATCAGGAACCTGCGCG | 62°C | | CHEN et al., 2017 |
| 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 | CTGTCTGCGAACACATTAC | 62°C | | |
| ompA-FM | TGGCGGTAAAGATGGTAAC | 57°C | | MARTINS et al., 2016 |
| ompA-RM | CCTAAAGTACCTTCTTCTGAGTTAC | | 327 | |
| ompA-RBM | TTCCAGAACTCTTCATCAGC | | 423 | |
| csuE-FM | CGATTGTGGGAATCGGTGCC | | 239 | |
| csuE-FBM | TTGGCGAACATGACCTATT | | 531 | |
| csuE-RM | CACATAATATGGTGTATTTACCGAA | | | |
| OXA-51FM | AGTATTTAAGTGGGACGGGC | | 114 | |
| OXA-51RM | CGACGAGCTAAATCTTGATAAACC | | | |
| Ac696F | TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG | 60°C | 857 | LA SCOLA et al., 2006 |
| Ac1598R | CGBGCRTGCATYTTGTCRT | | | |
| ISAbA1F | GTTATATCTTATCTTAAACA | 56°C | | MERKIER et al., 2008 |
| ISAbA1R | GCTCACCGATAAACTCTCT | | | |
| ISAbA2A | AATCCGAGATAGAGCGGTTTC | | | POIREL; NORDMANN, 2006 |
| ISAbA2B | TGACACATAACCTAGTGACAC | | | |
| ISAbA3A | CAATCAAATGTCCAACCTGC | 50°C | | |
| ISAbA3B | CGTTTACCCCAAACATAAGC | | | |
| ISAbA4A | ATTTGAACCCATCTATTGGC | | | CORVEC et al., 2007 |
| ISAbA4B | ACTCTCATATTTTTCTTGG | | | |

^a Temperatura de anelamento

BUENO, M. F. C. et al. Coproduction of 16S rRNA Methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M Group Extended-Spectrum beta-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2397-2400, 2013.

CHEN, Y. et al. Spread of the blaOXA-23-containing Tn2008 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates grouped in CC92 from China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, a. 163, p. 1 -6, 2017.

CORVEC, S. et al. Genetics and Expression of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Gene *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1530-1533, 2007.

DOYLE, D. et al. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877-3880, 2012.

HIDALGO, L. et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 1543-1550, 2013.

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.

KODORI, M. et al. The impact of primer sets on detection of the gene encoding biofilm-associated protein (Bap) in *Acinetobacter baumannii*: *in silico* and *in vitro* analysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 304-308, 2017.

KRAYCHETE, G. B. et al. 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.

LA SCOLA, B., et al. Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 827-832, 2006.

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.

MARTINS, N. et al. A new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clones. **Infection, Genetics, and Evolution**, v. 42, p. 41-45, 2016.

MENDES, R. E. et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time pcr assay and melt curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 544-547, 2007.

MERKIER, A. K. et al. Polyclonal spread of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 3, p. 235-240, 2008.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition and Expression of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Gene *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1442-1448, 2006.

REBELO, A. R. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. **Eurosurveillance**, p. 1-11, 2018.

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-beta-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1261-1262, 2006.

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.