GLEICE CRISTINA LEITE

Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas contra isolados de *Acinetobacter baumannii* multidrogas resistentes com avaliação dos mecanismos de resistência

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profª Dra Silvia Figueiredo Costa

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Leite, Gleice Cristina

Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas contra isolados de *Acinetobacter baumannii* multidrogas resistentes com avaliação dos mecanismos de resistência / Gleice Cristina Leite. -- São Paulo, 2016.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.*Acinetobacter baumannii* 2.Sinergismo 3.Resistência microbiana a medicamentos 4.Sequenciamento 5.Colistina 6.Carbapenêmicos

USP/FM/DBD-368/16

Dedico,

Aos meus sobrinhos, *Sophia* e *Ricardo*, que meu trabalho seja uma semente de determinação e dedicação plantado dentro de cada um de vocês...

Aos meus pais, *Sonia* e *Paulo Roberto,* e à minha irmã *Glauce,* por tudo o que sou e por quem me tornei...

Ao meu companheiro de vida e de sonhos, *Carlos,* que com amor me faz sorrir até dos meus próprios medos...

AGRADECIMENTOS

Finalizar uma tese de doutorado é ir além do imaginado, é a prova que não existem obstáculos quando se tem perseverança, determinação e cultivo de valores familiares.

Agradeço sempre a *Deus* pelo dom da vida e por me dar sabedoria e força para superar as dificuldades.

À Profa. Dra. *Silvia Figueiredo Costa*, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela confiança, pela paciência e pelo exemplo de competência e dedicação.

A todos os amigos do Laboratório de Investigação Média 54 (LIM-54), funcionários, ex-funcionários, alunos, ex-alunos e estagiários, pelo apoio técnico, por compartilharem conhecimento e, principalmente, pela amizade e bons momentos vividos dentro e fora do laboratório.

À amiga *Cristina Kamia*, pelos incansáveis checkerboard e time-kill, pela amizade, apoio e incentivo.

À amiga *Ana Paula Marchi*, pelo apoio, disposição e por estar tão perto mesmo quando estávamos longe.

À amiga *Andreia Alcaia*, por todo apoio, em especial pelas conversas e conselhos.

Aos meus pais, *Paulo* e *Sonia*, por serem meu exemplo de vida, pelo apoio e pelos incentivos.

À minha irmã, *Glauce*, pelo exemplo de determinação, confiança e por compartilhar meus sonhos.

Ao meu esposo, *Carlos*, pelos incentivos, pelas doses de ânimo, pelos conselhos e pela paciência.

Aos meus sobrinhos, *Sophia* e *Ricardo*, minhas fontes de inspiração, simplesmente por existirem.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Médica – 54 da Divisão de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro ao aluno financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS
RESUMO
ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO..... 1

1.1. Características gerais de *Acinetobacter baumannii*..... 1
1.1.1. Aspectos epidemiológicos..... 3
1.1.2. Fatores de virulência 3
1.2. Mecanismos de resistência desenvolvidos por *Acinetobacter baumannii*..... 6
1.2.1. Produção de enzimas β-lactamases..... 7
1.2.1.1. Carbapenemases..... 9
1.2.1.1.1. Oxacilinases..... 9
1.2.1.1.2. Metalo-β-lactamases..... 13
1.2.1.2. β-lactamases de Espectro Estendido..... 14
1.2.2. Alteração da permeabilidade da membrana externa..... 15
1.2.3. Efluxo do antimicrobiano..... 16
1.2.4. Alteração do sítio de ligação da droga..... 17
1.2.5. Alteração do lipopolissacarídeo..... 17
1.3. Teste *in vitro* de combinações antimicrobianas..... 18
1.3.1. Combinação antimicrobiana contra *Acinetobacter baumannii*..... 20
1.4. Justificativa do estudo..... 24

2. OBJETIVOS..... 25

2.1. Objetivos Principais..... 25
2.2. Objetivos Secundários…… 25

3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 26

3.1. Isolados bacterianos..... 26
3.2. Cultivo e armazenamento..... 26
3.3. Cepas controle..... 28
3.4. Antimicrobianos utilizados no estudo..... 28
3.5. Determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo..... 30

3.5.1. Preparo das diluições em microplacas..... 30
3.5.2. Preparo da suspensão bacteriana..... 30
3.5.3. Inoculação da suspensão bacteriana..... 31
3.5.4. Leitura das concentrações inibitórias mínima..... 31
3.6. Ágar diluição..... 32
3.6.1. Preparo das placas em concentrações seriadas..... 33
3.6.2. Preparo da suspensão bacteriana..... 33
3.6.3. Aplicação da suspensão bacteriana na placa..... 33
3.6.4. Leitura da concentração inibitória mínima por ágar diluição..... 34
3.7. Determinação da concentração inibitória mínima da fosfomicina por microdiluição em caldo..... 34
3.7.1. Preparo das diluições em microplacas..... 34
3.7.2. Preparo da suspensão bacteriana..... 35
3.7.3. Inoculação da suspensão bacteriana..... 35
3.7.4. Leitura das concentrações inibitórias mínima..... 35
3.8. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)..... 36
3.8.1. Preparo da suspensão bacteriana..... 36
3.8.2. Preparo dos blocos de agarose..... 37
3.8.3. Extração do DNA bacteriano..... 37
3.8.4. Restrição enzimática..... 37
3.8.5. Preparo do gel de agarose e tampão TBE 0.5 x para eletroforese.... 38
3.8.6. Interpretação do PFGE..... 38
3.9. Avaliação das combinações antimicrobianas por c*heckerboard*..... 39
3.9.1. Preparo das diluições dos antimicrobianos..... 39
3.9.2. Preparo das placas de *checkerboard*..... 39
3.9.3. Preparo da suspensão bacteriana..... 40
3.9.4. Leitura do *checkerboard*..... 40
3.9.5. Interpretação das combinações antimicrobianas..... 40
3.10. *Time-kill*..... 41
3.10.1. Preparo do teste de *time-kill*..... 42
3.10.2. Interpretação do *time-kill*..... 42
3.11. Reação em Cadeia da Polimerase 43
3.11.1. Amplificação dos genes de carbapenemases..... 43
3.11.2. Amplificação dos genes de proteína de membrana externa..... 43
3.11.3. Amplificação dos genes da biossíntese do LPS e do sistema regulatório PmrCAB..... 44
3.12. Avaliação das proteínas de Membrana Externa 46
3.12.1. Extração das proteínas de membrana externa..... 46
3.12.2. Quantificação das proteínas de membrana externa..... 47
3.12.3. Preparo e corrida do SDS-PAGE..... 47
3.13. Sequenciamento do genoma total bacteriano por Íon Torrent PGM™..... 47
3.13.1. Preparo da biblioteca..... 48

3.13.2. PCR em emulsão..... 49
3.13.3. Montagem do sequenciamento genômico..... 49
3.13.4. Análise do sequenciamento genômico..... 50
3.14. Sequenciamento do genoma total bacteriano por MiSeq Illumina™..... 51
3.15. Determinação do MLST..... 52
3.16. Avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo..... 53
3.16.1. Preparo do sedimento bacteriano..... 53
3.16.2. Extração do RNA..... 53
3.16.3. Reação de amplificação quantitativa..... 54
3.16.4. Análise da amplificação..... 54

4. RESULTADOS..... 56

4.1. Isolados bacterianos..... 56
4.2. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos..... 56
4.3. Identificação de genes de resistência de 20 isolados de *A. baumannii* por PCR..... 57
4.4. Análise das proteínas de membrana externa..... 58
4.5. Perfil molecular dos isolados por PFGE..... 59
4.6. Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas pelo método de *checkerboard*..... 60
4.7. Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas pelo método de *time-kill*..... 62
4.8. Analise do sequenciamento genômico..... 65
4.9. Identificação de mutação genética no sistema regulatório PmrCAB e genes da biossíntese do LPS..... 69
4.10. MLST determinados nos isolados sequenciados..... 71
4.11. Expressão gênica do sistema regulatório PmrCAB e dos genes da biossíntese do LPS por meio da PCR quantitativa..... 72
4.12. Avaliação dos efeitos das combinações antimicrobianas e dos mecanismos de resistência..... 72

5. DISCUSSÃO..... 75

6. CONCLUSÃO..... 86

7. ANEXOS..... 87

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação das beta-lactamases de acordo com Bush e cols 2010. FMUSP, São Paulo..... 8

Quadro 2. Grupos de oxacilinases identificadas em isolados de *A. baumannii* e suas respectivas variantes. FMUSP, São Paulo..... 10

Quadro 3. Estudos com combinações antimicrobianas contra isolados de *Acinetobacter baumannii*. FMUSP, São Paulo..... 22

Quadro 4. Cepas controle obtida da ATCC de acordo com os experimentos realizados. FMUSP, São Paulo..... 28

Quadro 5. Pontos de corte dos antimicrobianos utilizados para determinação da CIM de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2013). FMUSP, São Paulo..... 31

Quadro 6. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos estabelecidos pelo CLSI e EUCAST. FMUSP, São Paulo..... 32

Quadro 7. Condições de corrida estabelecidas para PFGE de *A. baumannii* em CHEF DRIII – BioRad. FMUSP, São Paulo..... 38

Quadro 8. Sequência de oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento utilizadas no estudo. FMUSP, São Paulo..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados prévios utilizados para seleção dos 20 isolados de *A. baumannii*. FMUSP, São Paulo..... 27

Tabela 2. Concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo dos antimicrobianos incluídos na pesquisa para os 20 isolados de *Acinetobacter baumannii*. FMUSP, São Paulo..... 56

Tabela 3. Proteínas de membrana externa dos 20 isolados de *A. baumannii* relacionados ao CIM dos carbapenêmicos e aos genes de resistência aos carbapenêmicos detectados pela PCR no estudo. FMUSP, São Paulo..... 58

Tabela 4. Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de *checkerboard* e *time-kill* nas combinações com maior número de efeito sinérgico. FMUSP, São Paulo..... 63

Tabela 5. Genes de mecanismos de resistência determinados pelo sequenciamento genômico total pela metodologia Ion Torrent e Illumina para quinze isolados de *A. baumannii.* FMUSP, São Paulo..... 67

Tabela 6. Genes de virulência com mutações dos isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina 23 e 25 comparados ao isolado 28. FMUSP, São Paulo..... 68

Tabela 7. Substituição de aminoácidos e expressão dos genes *pmrC, pmrA* e *pmrB* dos isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina. FMUSP, São Paulo..... 70

Tabela 8. Perfil molecular dos isolados submetidos ao sequenciamento do genoma total (n=15) e seus respectivos ST e CC. FMUSP, São Paulo..... 71

Tabela 9. Avaliação dos mecanismos de resistência dos 20 isolado de *A. baumannii* com relação aos resultados sinérgicos apresentados para cada grupo de drogas testados. FMUSP, São Paulo..... 74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Potencial papel da bomba de efluxo AdeFGH para virulência. FMUSP, São Paulo..... 4

Figura 2. Definições esquematizadas dos efeitos das combinações antimicrobianas. FMUSP, São Paulo..... 19

Figura 3. Diagrama das combinações antimicrobianas testadas no presente estudo contra isolados de *A. baumannii* multidrogas resistentes. FMUSP, São Paulo..... 29

Figura 4. Dendrograma de avaliação da variabilidade genética para os 20 isolados de *A. baumannii* de acordo com identificação dos isolados e seus respectivos perfis clonais, ano de coleta, unidade de internação e CIM de colistina e imipenem. FMUSP, São Paulo..... 59

Figura 5. Efeito das combinações antimicrobianas, realizados pelo método de *checkerboard* e interpretado pelo método de *two-well* para os 20 isolados de *A. baumannii*. FMUSP, São Paulo..... 60

Figura 6. Efeito das combinações antimicrobianas, pelo método de *checkerboard* interpretado por *two-well*, para os 7 isolados resistentes a colistina. FMUSP, São Paulo..... 61

Figura 7. Cinética de crescimento em função do tempo de diferentes combinações antimicrobianas. FMUSP, São Paulo..... 64

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

AD	Ágar Diluição
AMI	Amicacina
ATB	Antimicrobiano
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
CIF	Concentração Inibitória Fracionária
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMHCA	Caldo Muller Hinton Cátion Ajustado
COL	Colistina
Cols	Colaboradores
Ct	Cycle threshold
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ESBL	β-lactamase de espectro estendido
E-test	Epsilometer test
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FOS	Fosfomicina
GEN	Gentamicina
G-6-P	D-glicose-6-fosfato
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IMI	Imipenem
IMP	Imipenemase
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

LIM-54	Laboratório de Investigação Médica – 54
LIM-03	Laboratório de Investigação Médica – 03
LPS	Lipopolissacarídeo
Log	Logaritmo
MAFFT	Multiple Alignment Fourier Transform
MBL	Metalo-β-lactamase
MDR	Multidrogas Resistentes
MER	Meropenem
MLST	Multilocus Sequence Typing
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	N-acetilmurâmico
OMP	Proteína de Membrana Externa
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Open Reading Frames – Quadro Aberto de Leitura
OXA	Oxacilinase
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PBS	Tampão fosfato sódico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCRq	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis – Eletroforese de Campo Pulsado
PGM	Personal Genome Machine
PMSF	Fluoreto de fenil-metil-sulfonila
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucleico
RND	Resistance Nodulation-cell Division superfamily
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
ST	Sequence Type
TIG	Tigeciclina
TSB	Caldo triptona de soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

VAN	Vancomicina
bp	Pares de base
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
G	Grama
Kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
s	Segundos
xg	Rotação por gravidade

RESUMO

Leite GC. *Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas contra isolados de Acinetobacter baumannii multidrogas resistentes com avaliação dos mecanismos de resistência*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Acinetobacter baumannii é um importante agente de infecções relacionadas à assistência à saúde, principalmente nas unidades de terapia intensiva no Brasil, sua resistência a antimicrobianos vem aumentando nas últimas décadas e as opções para o tratamento são restritas. Em 2011, no HC-FMUSP, ocorreu um surto de infecção por *A. baumannii* resistente a todos os antibióticos e desde então isolados resistentes a todas as classes de antibióticos vêm sendo identificados no hospital. O estudo investigou o efeito de combinações antimicrobianas contra 20 isolados clínicos de *A. baumannii,* sendo sete isolados resistentes (2011 a 2012) e treze sensíveis a colistina (2002 a 2004), obtidas do banco de cepas do LIM-54 com diferentes mecanismos de resistência. Foram realizados, concentração inibitória mínima dos antibióticos, avaliação da clonalidade por *Pulsed-field gel electrophoresis*, detecção de mecanismos de resistência por reação de amplificação em cadeia da polimerase, análise de proteínas da membrana externa e baseado na clonalidade e o sequenciamento total do genoma de quinze isolados. Sinergismo foi investigado usando os métodos de *checkerboard* e *time-kill*. Para monitorização da expressão do sistema regulatório PmrCAB e dos genes responsáveis pela biossíntese do lipopolissacarídeo, foi realizada reação em cadeia da polimerase quantitativa. Todos os isolados foram resistentes ao meropenem e a rifampicina. OXA-23 e OXA-143 foram as carbapenemases mais frequentes. Quatro isolados mostraram perda de uma proteína de membrana externa denominada OMP 43kDa. Os isolados sensíveis a colistina pertenciam a diferentes clones e *Multilocus Sequence Types*, também apresentaram o maior efeito sinérgico com fosfomicina-amicacina. A resistência a colistina foi associada com a superexpressão do gene *pmrA*. Seis isolados resistentes a colistina, pertenciam ao Complexo Clonal 113 e o maior efeito sinérgico foi observado com combinações de colistina-rifampicina seguido de colistina-vancomicina. Foram encontrados diferentes genes de virulência envolvidos com formação de biofilme, aderência, produção de enzimas e captação de ferro.

Descritores: *Acinetobacter baumannii*; sinergismo; resistência microbiana a medicamentos; sequenciamento; colistina; carbapenêmicos.

ABSTRACT

Leite GC. *Determination of antimicrobial combinations effect against Acinetobacter baumannii multidrug-resistant isolates with evaluation of resistance mechanisms.* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Acinetobacter baumannii is an important agent of infections related to health care, especially in intensive care units in Brazil, its antimicrobial resistance has increased in recent decades and the options for treatment are restricted. In 2011, in the HC-FMUSP, there was an outbreak of *A. baumannii* infection resistant to all antibiotics and since then isolates resistant to all classes of antibiotics have been identified in the hospital. The study investigated the effect of antimicrobial combinations against 20 clinical isolates of *A. baumannii*, seven isolates colistin resistant (2011-2012) and thirteen colistin sensitive (2002-2004) from LIM-54 strains bench with different resistance mechanisms. Minimum inhibitory concentration of antibiotics, clonality evaluation by pulsed-field gel electrophoresis and detection of resistance mechanisms by polymerase chain reaction, outer membrane protein analysis and based on clonality, the whole genome sequencing of fifteen isolates were performed. Synergism was determined using checkerboard and time-kill methods. For expression monitoring of the regulatory system PmrCAB and the genes responsible for the biosynthesis of lipopolysaccharide, it was performed quantitative polymerase chain reaction. All isolates were resistant to meropenem and rifampicin. OXA-23 and OXA-143 were the most frequent carbapenems. Four isolates showed loss of one outer membrane protein called OMP 43kDa. Colistin susceptible isolates belonged to different clones and Multilocus Sequence Types; it also showed the greatest synergistic effect with fosfomycin-amikacin. The colistin resistance was involved in overexpression of the *pmrA* gene. Six colistin-resistant isolates belonged to Clonal Complex 113 and higher synergistic effect were observed with colistin-rifampicin followed by colistin-vancomycin combinations for these isolates. We found different virulence genes involved in biofilm formation, adhesion, enzyme production and iron uptake.

Descriptors: *Acinetobacter baumannii;* synergism; drug resistance, microbial; sequence; colistin; carbapenems.

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas de saúde pública, na atualidade, é a escassez de alternativas para tratar infecções por bactérias multirresistentes e uma das causas de resistência aos antimicrobianos (ATB) é o uso excessivo e inadequado destes compostos nos hospitais (FALAGAS, 2014; KARAISKOS, 2014). O conhecimento detalhado dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, se faz necessário tanto para melhor adequação do tratamento das infecções, quanto para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas (PARK, 2016b; KRESSE, 2007).

Alguns estudos destacam o importante papel de bactérias não-fermentadoras no panorama de multirresistência, principalmente em relação as infecções nosocomiais; dentre essas, *Acinetobacter* é um dos gêneros de grande importância, devido ao número de isolados nos laboratórios de microbiologia e por frequentemente demonstrarem resistência intrínseca e resistência adquirida (VILLALON, 2013; YOON, 2013).

Diferentes métodos ajudam na avaliação dos mecanismos de resistência e patogenicidade, entre eles estudos de sequenciamento genômico, porém, mesmo com o aumento das pesquisas o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas e a diversificação genômica de *A. baumannii* ainda não são claros (LI, 2015).

1.1. Características gerais de *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii faz parte do grupo de cocobacilos Gram-negativos não-fermentadores amplamente distribuído no ambiente hospitalar, sendo muito eficaz em colonizar seres humanos e de difícil erradicação (CHERKAOUI, 2015). *A. baumannii* é uma importante causa de infecções adquiridas nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), em particular, infecções do trato respiratório e infecções de corrente sanguínea (GORDON, 2010a; YING, 2015).

A incidência de infecção por essa bactéria é alta e os fatores de risco incluem, permanência prolongada em UTIs, procedimentos invasivos, imunossupressão decorrente do uso de quimioterápicos, tratamento com antimicrobianos de amplo espectro, ventilação mecânica, queimaduras e procedimentos cirúrgicos (FIGUEIREDO, 2009; BEN, 2011).

Sua importância clínica, principalmente nos últimos anos, tem sido impulsionada pela capacidade de se autorregular ou adquirir resistência (PELEG, 2008). Vários fatores favorecem o desenvolvimento de multirresistência em isolados de *A. baumannii*, entre eles, a capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo no ambiente hospitalar, potencializando sua disseminação (CHERKAOUI, 2015; FALAGAS, 2006). Isso ocorre devido à baixa exigência nutricional para o crescimento e a capacidade de multiplicar-se em diferentes níveis de temperaturas e pH (OPAZO, 2009).

Na última década, *A. baumannii* emergiu como um importante patógeno nosocomial em todo o mundo, por causa de sua notável capacidade de desenvolver resistência ao amplo espectro de agentes antimicrobianos (CORTIVO, 2015). Consequentemente as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), também aumentaram (PARK, 2016a; KIM, 2014). As IRAS são difíceis de tratar devido à resistência intrínseca deste agente a antimicrobianos, além disso, isolados de *A. baumannii* adquiriram uma grande variedade de resistência aos antibióticos e sofreram mutações genéticas, localizados no cromossoma ou plasmídeos (ZARRILLI, 2009; OU, 2015). No entanto, esta não é a única razão pela qual antibióticos falham, a formação de biofilme é uma outra forma eficaz para bactérias sobreviverem na presença de antibióticos (SINGHAI, 2012).

A resistência aos antimicrobianos tem sido identificada como um importante problema de saúde pública mundial (BRICEÑO, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (2001), entre os fatores associados com o desenvolvimento de resistência a antibióticos está o uso inadequado dessas drogas, a falta de sistemas de monitorização eficaz, a ausência de legislação para controlar a venda de medicamentos e o uso indiscriminado de antibióticos.

O problema da resistência bacteriana aos antimicrobianos se apresenta como um grave complicador da infecção hospitalar. Dentre os patógenos multirresistentes, o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* tem se tornado um desafio, isso devido a limitada escolha de antibióticos contra este agente (PELEG, 2008), tornando necessária combinações de várias drogas como estratégia terapêutica (BOYD, 2011; KLASTERSKY, 2014; PARK, 2016a).

No Brasil, *A. baumannii* tornou-se particularmente problemática devido à sua prevalência e a resistência a carbapenêmicos, geralmente relacionada a oxacilinases (OXA), envolvendo principalmente os agentes produtores de OXA-23 (CHAGAS, 2015).

1.1.1. Aspectos epidemiológicos

Acinetobacter baumannii é considerado um micro-organismo ubíquo na natureza e tem sido isolado a partir do solo, água, animais, pele e trato gastrointestinal de seres humanos saudáveis, além disso, em ambientes hospitalares, algumas espécies têm sido isoladas de objetos inanimados (BARCHITTA, 2009; KIM, 2014).

A. baumannii é um importante agente de infecções hospitalares comumente encontrado em hospitais brasileiros e representa uma ameaça particular para pacientes em UTIs (LASTORIA, 2014).

De acordo com relatório da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Acinetobacter* spp. foi classificado como o quarto patógeno mais prevalente, causando 2159 (11,8%) infecções de corrente sanguínea relacionadas ao cateter entre pacientes de UTI em 2013 (ANVISA, 2013). Infelizmente, taxas de resistência aos carbapenêmicos observadas entre esses patógenos foi extremamente elevada (80,7%) (VASCONCELOS, 2015).

Índices de resistência ao imipenem em isolados de *Acinetobacter* sp. aumentaram de 12,6% no período de 1997-1999 para 71,4% no período de 2008-2010 (GALES, 2012). Em 2005, as cepas de *A. baumannii* multirresistentes no Brasil constituíam 8,8% do total de infecções hospitalares em UTIs (KIFFER, 2005).

1.1.2. Fatores de virulência

Acinetobacter baumannii é a espécie de maior importância clínica do gênero *Acinetobacter*, responsável por uma série de infecções graves em pacientes debilitados e a prevalência de colonização mostra-se bem elevada, o que sugere uma baixa virulência (PELEG, 2008). Porém, diversos fatores de virulência e patogenicidade já identificados em *A. baumannii* podem ter um importante papel nos mecanismos de colonização e infecção. Entre estes, podemos mencionar a capacidade de se manter viável por longos períodos em superfícies secas, a aquisição de nutrientes essenciais como ferro e zinco, a adesão as células epiteliais levando a apoptose e a secreção de produtos tóxicos causando danos teciduais (POIREL, 2006; KARAGEORGOPOULOS, 2008; MARTINS, 2012).

Peleg e cols (2012) relatam diferentes genes envolvidos com a virulência em *A. baumannii* e suas respectivas funções, tais como biofilme. A formação de biofilme é

especialmente importante em IRAS, pois o uso de cateteres e ventiladores proporcionam superfícies ideais para aderência da bactéria e consequente formação do biofilme, promovendo a colonização e posterior infecção do paciente (DJERIBI, 2012; COELHO, 2006). Esse processo pode ser regulado pela atividade de genes do *quorum-sensing,* um sistema de sensoriamento composto por pequenas moléculas que se ligam a proteínas reguladoras de transcrição, regulando a expressão de alguns genes bacterianos, essas proteínas são denominadas N-acil-homoserina, codificadas pelo gene *abaI* em *A. baumannii* (BHARGAVA, 2010).

Também envolvidos com a formação de biofilme estão, bomba de efluxo AdeFGH (Figura 1), com papel potencial para a síntese pelo transporte de moléculas auto-indutoras durante a formação do biofilme (HE, 2015) e proteína associada à biofilme (BAP), que contribui para a formação de biofilme e adesão às células hospedeiras eucarióticas, codificadas pelo gene *bap* (BROSSARD, 2012).

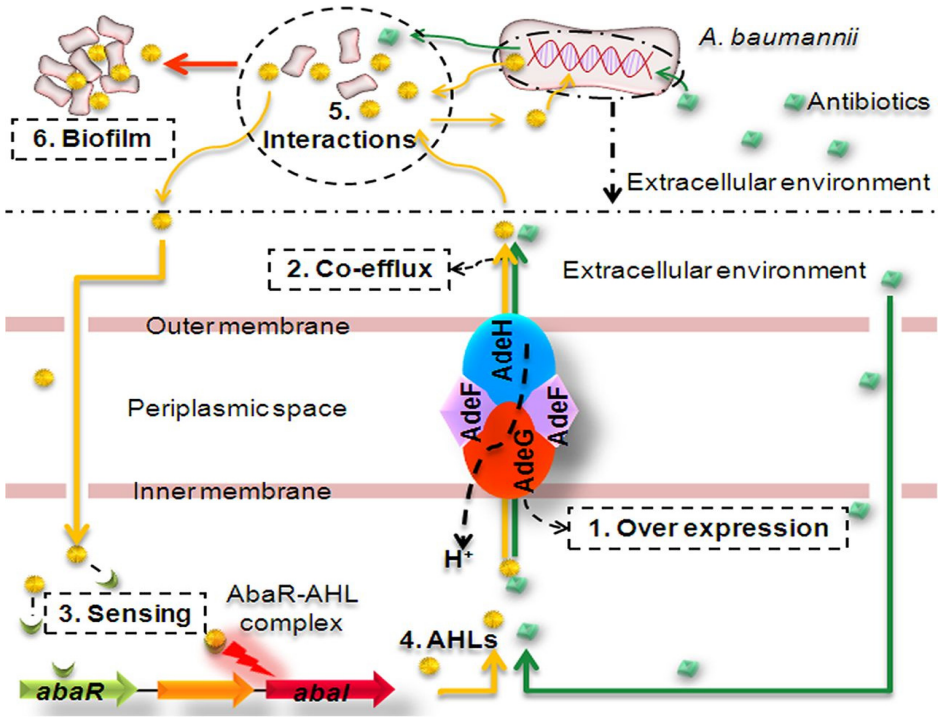


Figura 1. Potencial papel da bomba de efluxo AdeFGH para virulência. FMUSP, São Paulo. Fonte: HE e cols, 2015.

Estudos também relatam que a adesão das células de *A. baumannii* a superfícies é mediada pela ativação de diferentes sistemas, o sistema Csu fimbrias (*csuA/BABCDE*) que estimula a produção de píli, estruturas essenciais para as primeiras etapas da formação

do biofilme, proporcionando assim a aderência das células às superfícies abióticas (LOEHFELM, 2008), outra característica importante, é a produção de polissacarídeos, pelo operon *pgaABCD*, que compõe a matriz externa da formação do biofilme, mantendo a integridade da estrutura (CHOI, 2009). Além disso, a interação do píli e do lipopolissacarídeo (LPS) (*lpsB, lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxL, lpxM*) promovendo adesão as células hospedeiras e permitindo a evasão do sistema imune do hospedeiro, desencadeando uma resposta inflamatória, pode ser a primeira etapa na colonização (VILLEGAS, 2007).

Múltiplos fatores incluindo OmpA, Omp33-36 e fosfolipase C e D são necessários para invasão celular (RUMBO, 2014). A OmpA e a Omp33-36 interferem na fagocitose e contribuem para sobrevivência de *A. baumannii* no interior da célula hospedeira, ligam-se diretamente às células epiteliais e consequentemente desencadeiam a apoptose através de segmentação mitocondrial, é também responsável por promover a integridade da célula bacteriana (CHOI, 2008). Por sua vez, as fosfolipases são enzima lipolíticas que catalisam a clivagem de fosfolipídios.

Alguns autores citam a capacidade de *Acinetobacter* spp. crescer sob condições de deficiência de ferro, sugerindo a presença de sideróforo e capacidade de expressar grande afinidade por sistemas de captação de ferro, como acinetobactin, compostos por sideróforos (CHOI, 2005; JOLY-GUILLOU, 2005). Uma vez dentro das células hospedeiras, BasD e BauA, proteínas envolvidas na síntese e transporte de ferro (*bauDCEBA basCD*), são necessários para a sobrevivência do *A. baumannii* (CERQUEIRA, 2014). Outra proteína envolvida com a virulência em *A. baumannii* é a proteína ligadora de penicilina G (*pbpG*), proteínas de ligação à penicilina (PBPs) são mais comumente associados com a ligação e inativação de antibióticos β-lactâmicos, no entanto essa proteína participa das etapas finais da biossíntese da camada de peptidoglicano e, assim, contribuir para a estabilidade da célula bacteriana (JACOBS, 2010).

A regulação da expressão de características de virulência é essencial para patógenos. Vários reguladores de virulência têm sido identificados em *A. baumannii*. GacSA é um regulador de virulência essencial para a doença (CERQUEIRA, 2014). A mutação do gene *gac*S sensor de quinase altera a expressão de genes envolvido na síntese de píli, motilidade, e formação de biofilmes. O sistema regulador de dois componentes BfmRS

controla também vários fenótipos, incluindo a formação de biofilme, adesão às células do hospedeiro, e resistência ao soro humano (LIOU, 2014).

1.2. Mecanismos de resistência desenvolvidos por *Acinetobacter baumannii*

Os alvos da maioria de agentes antimicrobianos são localizados na parede celular, membrana citoplasmática ou dentro do citoplasma. Nas bactérias Gram-negativas a parede celular pode fornecer uma barreira intrínseca adicional impedindo que as drogas alcancem seus alvos (DOI, 2015; HARBARTH, 2005). As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a um antibiótico ou adquirirem resistência por meio da aquisição de genes plasmidiais ou por mutações (CHEN, 2009). A resistência adquirida reflete uma mudança na composição genética de uma bactéria que pode resultar em atividade antimicrobiana diminuída, mas não a perda completa da eficácia da droga (CHEN, 2009).

Muitos estudos têm associado à resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp apenas com a presença de enzimas hidrolíticas, subestimando o papel de outros mecanismos de resistência, tais como a alteração da membrana externa (MOSTACHIO, 2012).

Espécies de *Acinetobacter* geralmente apresentam resistência a várias classes de antimicrobianos e a resistência as cefalosporinas é uma característica comum em *A. baumannii* devido a produção da β-lactamase cromossômica AmpC. Apesar desta produção não ser induzível, como em algumas enterobactérias, a superexpressão do gene *ampC* é decorrente da sequência de inserção IS*Aba1* à montante deste gene (LIVERMORE, 2006). A resistência aos carbapenêmicos é bastante frequente pela disseminação de certos clones produtores de metalo-β-lactamases e oxacilinases, que semelhante as AmpC, a expressão das oxacilinases pode ser exacerbada pela inserção da IS*Aba1* (BOMONO, 2006).

Dentre os principais mecanismos de resistência de *A. baumannii* estão à produção de enzimas, mais frequentemente as β-lactamases, alteração da permeabilidade da membrana externa, efluxo do antimicrobiano e alteração do sitio de ligação da droga (LIVERMORE, 2002).

O mecanismo de resistência as polimixinas ainda não está completamente elucidado, podendo estar envolvido com alteração do LPS (LEE, 2004). Dois mecanismos de

resistência já foram descritos, um envolvendo a perda de LPS por mutação de um dos três principais genes da biossíntese de LPS (*lpxA, lpxC, lpxD*) e outro pela adição de fosfoetanolamina ao LPS pela mutação do *pmrCAB* (BECEIRO, 2014).

Acinetobacter baumannii também apresenta resistência a outros antimicrobianos como, por exemplo, rifampicina, tigeciclina e fosfomicina. A rifampicina é um inibidor da síntese de ácidos nucléicos, e atua diretamente nas enzimas que participam do processo de transcrição e replicação. A resistência a este antimicrobiano ocorre por mutação em *gyrA* (DNA girase) e *rpoB* (subunidade beta da enzima RNA polimerase), assim como por impermeabilidade de membrana e bomba de efluxo (MARTINEZ, 2002). Tigeciclina inibe a tradução de proteínas e impede a síntese de aminoácidos por ligação reversível à subunidade 30S do ribossomo bacteriano; vários estudos indicaram que a resistência a tigeciclina está associada com a superexpressão de sistemas de efluxo, particularmente membros da família *resistance-nodulation-cell division* (RND), que inclui o AdeABC, AdeIJK, e sistemas de efluxo AdeFGH em *A. baumannii* (SUN, 2013). Quanto a fosfomicina, é um agente antibacteriano que inibe a primeira etapa da formação da parede celular bacteriana, no entanto, apesar de bem elucidada para outros micro-organismos Gram-negativos, o mecanismo de resistência a fosfomicina em *A. baumannii* não é clara (FALAGAS, 2010).

1.2.1. Produção de enzimas β-lactamases

A primeira β-lactamase foi descrita em 1940 por Abraham e Chain antes mesmo do uso da penicilina para o tratamento de infecções bacterianas (BUSH, 1989). Desde então, inúmeras β-lactamases foram identificadas e vários esquemas de classificação foram propostos para agrupar estas enzimas de acordo com suas características bioquímicas e pela análise de suas estruturas moleculares (BUSH, 1989; BUSH, 2010; LIVERMORE, 1995). As β-lactamases foram divididas de acordo com suas estruturas primárias em quatro classes (A a D), segundo Ambler (1980). De acordo com as diferenças em seus mecanismos catalíticos, estas classes ainda podem ser classificadas dentro de dois grupos: serina-β-lactamases (classes A, C e D) e metalo-β-lactamases (classe B) (AMBLER, 1980; BUSH, 1995) ou de acordo com sua preferência por determinado substrato (classificação de Bush) (RASMUSSEN, 1997). Segundo Bush (2010) as β-lactamases podem ser divididas em três grupos como apresentada no Quadro 1.

Quadro 1. Classificação das *β*-lactamases de acordo com Bush e cols 2010. FMUSP, São Paulo.

Bush-Jacoby grupo (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros grupo (1995)	Classe molecular	Substrato	Inibidas por		Características
				CA ou TZB	EDTA	
1	1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Maior hidrolise de cefalosporinas que benzilpenicilina; hidrolizam cefamicinas
1e	NI	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrólise de ceftazidime e muitos outros oxyimino-β-lactamase
2ª	2a	A	Penicilinas	Sim	Não	Maior hidrolise de benzilpenicilina que cefalosporinas
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	Sim	Não	Hidrólise similares de benzilpenicilina e cefalosporinas
2be	2be	A	Cefalosporinas espectro estendido, monobactams	Sim	Não	Hidrolisa oxyimino-β-lactamase (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)
2br	2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistência para ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam
2ber	NI	A	Cefalosporinas espectro estendido, monobactams	Não	Não	Hidrolisa oxyimino-β-lactamase combinado com resistência para ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam
2c	2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	Hidrolisa a carbenicilina
2ce	NI	A	Carbenicilina, cefepime	Sim	Não	Hidrolisa carbenicilina, cefepime e cefpirome
2d	2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina
2de	NI	D	Cefalosporinas espectro extendido	Variável	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e oxyimino-β-lactamase
2df	NI	D	Carbapenems	Variável	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e carbapenems
2e	2e	A	Cefalosporinas espectro estendido	Sim	Não	Hidrolisa cefalosporinas, inibidas pelo ácido clavulânico, mas não aztreonam
2f	2f	A	Carbapenems	Variável	Não	Hidrolisa carbapenems, oxyimino-β-lactamase, cefamicinas
3ª	3	B (B1)	Carbapenems	Não	Sim	Hidrólise de amplo espectro, incluindo carbapenêmicos, mas não monobactams
		B (B3)	Carbapenems			
3b	3	B (B2)	Carbapenems	Não	Sim	Hidrolisam preferencialmente carbapenems
NI	4	DE				

Nota: CA – ácido clavulânico; TZB – tazobactam; NI – não incluída; DE – desconhecido.
Fonte: Adaptado de Bush, 2010.

1.2.1.1. Carbapenemases

São denominadas carbapenemases as β-lactamases com capacidade de hidrolisar principalmente os antimicrobianos carbapenêmicos. Essas enzimas podem ser divididas segundo suas características, em dois grupos: as que possuem em seu sítio alvo um grupamento serino (oxacilinases) e aquelas que possuem em seu sítio alvo um átomo de zinco (metalo-β-lactamases) (QUEENAN, 2007).

As carbapenemases da classe A de Ambler incluem membros designados SME, IMI, NMC, GES e a família das KPCs. Já a classe D de carbapenemases consiste no grupo OXA (oxacilinases), frequentemente descrita em *A. baumannii,* já a classe B são constituídas por metalo-β-lactamase (IMP, VIM, SIM, SPM, GIM, AIM, KHM e NDM) (LIVERMORE, 2002), identificada primeiramente em *Pseudomonas aeruginosa* (QUEENAN, 2007).

1.2.1.1.1. Oxacilinases

As oxacilinases estão entre as primeiras β-lactamases detectadas, porém essas enzimas eram originalmente raras e mediadas por plasmídeo (EVANS, 2014). A partir da década de 1980 surgiram isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos que manifestavam β-lactamases codificadas por plasmídeos (OXA-23, OXA-24, OXA-58). Logo foi verificado que todas as cepas possuíam uma oxacilinase cromossomal (OXA-51) e algumas poderiam conferir resistência a carbapenêmicos quando o ambiente genético a sua volta promovia a expressão (EVANS, 2014).

O primeiro grupo de oxacilinases identificado em *A. baumannii* foi o grupo OXA-23, em isolados do Reino Unido em 1985. A produção da enzima conferia resistência a carbapenêmicos e não necessitava de outros mecanismos de resistência para elevação da concentração inibitória mínima (CIM) (LYON, 1985). O segundo grupo foi identificado na Espanha em 1997, denominado OXA-24/40 (BOU, 2000), também conferindo resistência aos carbapenêmicos.

O maior grupo de oxacilinase identificado até o momento é o grupo OXA-51, a enzima OXA-51, que nomeia o grupo, foi determinada em 1996 em isolados provenientes da Argentina, essas são intrínsecas de *A. baumannii* e encontradas naturalmente no cromossomo da espécie (BROWN, 2005; PFEIFER, 2011).

Outros grupos de oxacilinases encontrados em isolados de *A. baumannii* são o grupo OXA-58, identificado na França em 2003 (POIREL, 2005), e o grupo OXA-143 determinado em isolados de *A. baumannii* multirresistentes de pacientes brasileiros (HIGGINS, 2009), esse grupo inicialmente restrito ao Brasil também já foi identificado na Coréia do Sul (KIM, 2010).

A mais recente oxacilinase descrita em *A. baumannii* é a OXA-48, essa enzima representa um preocupante desenvolvimento de resistência a carbapenêmicos da última década. Análises da enzima OXA-48 mostram uma maior atividade contra imipenem do que contra meropenem (GONÇALVES, 2013).

No Quadro 2 estão apresentados os seis grupos identificados em *A. baumannii,* e suas respectivas variantes.

Quadro 2. Grupos de oxacilinases identificadas em isolados de *A. baumannii* e suas respectivas variantes. FMUSP, São Paulo.

Grupo	Variantes
OXA-23-like	OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133, OXA-134, OXA-146, OXA-165–OXA-171, OXA-225, OXA-239
OXA-40-like	OXA-40, OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160, OXA-207
OXA-51-like	OXA-51, OXA-64, OXA-71, OXA-75, OXA-80, OXA-82, OXA-84, OXA-86, OXA-95, OXA-98, OXA-100, OXA-104, OXA-106, OXA-113, OXA-115, OXA-117, OXA-120, OXA-128, OXA-130, OXA-132, OXA-138, OXA-144, OXA-148, OXA-150, OXA-172, OXA-180, OXA-194, OXA-197, OXA-200, OXA-203, OXA-206, OXA-208, OXA-216, OXA-217, OXA-219, OXA-223, OXA-241, OXA-242, OXA-248, OXA-250, OXA-254
OXA-58-like	OXA-58, OXA-96, OXA-97, OXA-164
OXA-143-like	OXA-143, OXA-182, OXA-231, OXA-253, OXA-255
OXA-48-like	OXA-48, OXA-48b, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-247

Adaptado de EVANS, 2014.

No Brasil, *A. baumannii* tornou-se particularmente problemático devido à sua prevalência e a resistência aos carbapenêmicos, geralmente relacionado com oxacilinase, envolvendo principalmente isolados produtores de OXA-23, sendo relatos de surtos locais desde o final dos anos 90 (CHAGAS, 2014).

Uma variedade de carbapenemases, principalmente a OXA-23, foi identificada em isolados de *A. baumannii* na América Latina, incluindo Brasil, Colômbia e Argentina (TOGNIM, 2004). Estudos indicam a emergência deste patógeno no Brasil, especialmente em isolados que apresentam resistência aos carbapenêmicos (taxa de 25-45%) através da produção de OXA-23, detectada em 63% dos isolados (ROSSI, 2011).

Surtos por *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos são observados desde 1990 (FERNÁNDEZ-CUENCA, 2003). O primeiro caso no Brasil foi reportado em 2003 por Dalla-Costa e cols, depois em 2007 na cidade de Porto Alegre (SCHIMITH, 2010), desde então casos endêmicos são observados no país. Pagano e cols (2015) realizaram um estudo, em Porto Alegre, 5 anos após o primeiro surto e observaram que os isolados do estudo atual mantiveram as mesmas características que o estudo anterior. Casos de infecção de corrente sanguínea por *A. baumannii* produtor de OXA-23 em hospital universitário de São Paulo, mostrou letalidade de 61,9% a despeito do uso apropriado de antibióticos (FURTADO, 2011).

Outro estudo, realizado por Chagas e cols (2014), investigou a relação genética entre os isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos de onze estados brasileiros no período de 2008-2011, indicando a presença do gene $bla_{\text{OXA-23}}$ na maioria dos isolados.

Estudo anterior relatou a presença de dois grandes agrupamentos, os complexos clonais (CC) 15 e 79, de *A. baumannii* multirresistente abrigando o gene $bla_{\text{OXA-23}}$ em diferentes estados brasileiros. O CC15 foi descrito em nove estados brasileiros (Alagoas, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul), pertencentes às quatro regiões geográficas diferentes do país (CHAGAS, 2014). A carbapenemase OXA-23 também tem sido associada com clones específicos, principalmente CC92, o qual é o maior e mais generalizado complexo clonal (CC) no banco de dados *Multilocus sequence types* (MLST) *A. baumannii* sendo identificados em muitos países (LEE, 2012; NIGRO, 2012; FU, 2010). Nos países latino-americanos, perfis alélicos não foram relacionados ao complexo clonal internacional predominante - CC92 (CLÍMACO, 2013), o mesmo estudo relatou cepas de *A. baumannii* carregando genes $bla_{\text{OXA-23}}$ pertencendo ao CC104 (ST103,

236, 402 e 404), CC109 (ST108, 109, 405 e 406) e CC113 (ST99, 113 e 227). Outros CCs relatados no país estão associados aos ST236 (CC103) e ST233 (CC113), descritos por Coelho-Souza e cols em 2003.

O papel da presença de oxacilinases em isolados de *Acinetobacter* spp resistentes aos carbapenêmicos, vem sendo bastante estudado nos últimos anos. Entretanto, essa resistência é atribuída, por muitos autores brasileiros, às OXA-23, OXA-58 e OXA-143 (FERREIRA, 2011; DE SOUZA GUSATTI, 2012; MEDEIROS, 2010).

A primeira identificação da enzima OXA-23 no país ocorreu por ocasião de um surto de *Acinetobacter* spp resistente aos carbapenêmicos, descrito em Curitiba por Dalla-Costa, 2003. Outros surtos já foram descritos, Carvalho e cols (2009) relataram a presença do gene $bla_{\text{OXA-23-like}}$ em oito hospitais do Rio de Janeiro, demais mecanismos de resistência descritos em *Acinetobacter*, entretanto, não foram explorados nesses estudos. Estes autores não pesquisaram a presença de sequências de inserção que levam a hiperexpressão destes genes, tampouco avaliaram a hidrólise dos carbapenêmicos por essas enzimas. Portanto, considerar as oxacilinases como o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos dos isolados de *Acinetobacter,* no Brasil, é simplificar a complexidade deste problema.

Os primeiros casos da presença de OXA-58 relatados no Brasil, foram em São Paulo e Rio de Janeiro (FIGUEIREDO, 2011). Essa enzima confere resistência aos carbapenêmicos, monobactâmicos e cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (MEDEIROS, 2010).

Estudo conduzido no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) (MOSTACHIO, 2012), no qual foram avaliados 50 isolados de *Acinetobacter* resistentes aos carbapenêmicos, mostrou que 10%, de um total de cinco isolados, apresentaram o gene bla_{IMP}, 18% o gene $bla_{\text{OXA-51-like}/\text{OXA-23-like}}$, e somente um isolado não apresentou o grupamento IS*Aba1* adjacente ao gene codificador da enzima OXA-23. Observou-se, ainda, que na maioria dos isolados, as proteínas CarO (29 kDa), proteínas de 33-36 kDa e 43 kDa estavam diminuídas ou ausentes. Três isolados apresentaram total ausência dessas proteínas. Esses dados mostraram que, nos isolados de *Acinetobacter* spp do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), a resistência aos carbapenêmicos foi decorrente da associação de mecanismos de resistência e que o papel das carbapenemases pode ter sido superestimado em outros estudos brasileiros.

No ano de 2009, foi relatada na França uma nova classe de oxacilinase, a OXA-143 em estudo realizado com cepas brasileiras. Essa nova classe possui uma similaridade de 88% com a sequência de aminoácidos da OXA-40, 63% de similaridade com a OXA-23 e 52% de similaridade com a OXA-58 (HIGGINS, 2009).

Outra oxacilinase encontrada no Brasil é a OXA-72, relatada esporadicamente, a enzima faz parte do grupo das OXA-24/40, confere resistência a carbapenêmicos e cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (WERNECK, 2011).

1.2.1.1.2. Metalo-β-lactamases

Metalo-β-lactamases (MBL) pertencem ao grupo 3 da classificação de Bush e a classe B de Ambler, possuem maior eficiência em hidrolisar os carbapenêmicos quando comparadas às oxacilinases. São capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, mas não possuem ação contra o aztreonam. São resistentes a ação da maioria dos inibidores de β-lactamases (QUEENAN, 2007). Essas enzimas necessitam de zinco em seu sítio alvo para exercer sua função hidrolítica, por isso perdem sua atividade na presença do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), um quelante de zinco e outros cátions bivalentes (QUEENAN, 2007).

Muito importante clinicamente, as variantes de MBL adquiridas podem estar associados a elementos genéticos móveis, plasmídeos e tranposons, sendo facilmente transferidos entre diferentes cepas da mesma espécie e de espécies diferentes (QUEENAM, 2007). A primeira MBL foi detectada no Japão em 1991 e denominada Imipenemase (IMP) (WATANABE, 1991), a segunda família foi identificada em Verona, Itália e denominada Verona Imipenemase (VIM) (LAURETTI, 1999). Posteriormente surgiram suas variantes e no início do século outras famílias foram identificadas, SPM-1 no Brasil (GALES, 2003), GIM-1 na Alemanha (CASTANHEIRA, 2004), SIM-1 em Seoul (LEE, 2005), AIM na Austrália (YONG, 2007), KHM no Japão (SEKIGUCHI, 2008) e NDM em New Deli, Índia (YONG, 2009).

No Brasil, o primeiro relato de cepas produtoras de MBL ocorreu em 2002, em isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos (GALES, 2003), desde então já foram descritas diferentes classes de MBL (BERTONCHELI, 2008; LARANJEIRA, 2010).

A mais recente, NDM, tem sido descrita na América Latina desde 2011 (PASTERAN, 2012). Em isolados de *A. baumannii,* no Brasil, o primeiro relato foi em um hospital de Londrina, Paraná (PILLONETTO, 2014). Um estudo recente relata a presença de IMP-10 em isolados de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos em hospital terciário de São Paulo, inicialmente reportados em isolados de *P. aeruginosa* no Japão (CAYÔ, 2015; IYOBE, 2002).

1.2.1.2. β-lactamases de Espectro Estendido

A produção de β-lactamase de espectro estendido (ESBL) tem emergido como um importante mecanismo de resistência a antimicrobianos β-lactâmicos (DALMARCO, 2006).

O desenvolvimento de resistência às cefalosporinas de terceira geração foi um grande avanço na luta contra isolados multidrogas resistentes (MDR). No entanto, devido à utilização frequente destes agentes, novos plasmídeos que codificam β-lactamase capaz de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido foram relatadas pela primeira vez em 1983 (KNOTHE, 1983).

As ESBL são mutantes, mediadas por plasmídeo e produzidas por bacilos Gram-negativos resistentes à penicilina, cefalosporinas e monobactâmicos, são comumente reconhecidas em *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* e são encontrados em todo o mundo (RAWAT, 2010).

Entre os vários tipos encontrados, as enzimas derivadas de TEM e SHV, são as mais frequentes. Mutações nos genes que codificam β-lactamases TEM e SHV podem expandir o espectro de atividade dessas enzimas, tornando-as capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas (exceto cefamicinas: cefoxitina e cefotetan), incluindo as de amplo espectro e o aztreonam (BRADFORD, 2001).

Estudos recentes mostram a presença de ESBL em isolados de *A. baumannii.* Alyamani e cols (2015) reportaram a presença de TEM (71%) e CTX-M (81%) do grupo 1, 2, 8, 9 e 25 em isolados de *A. baumannii* provenientes de um hospital local de Makkah, Arábia Saudita. A presença de TEM (20%) e SHV (58%) também foi reportada em estudo realizado no Iran (SAFARI, 2015). Na China, o estudo conduzido por Yang e cols (2015) mostrou 96% de TEM e 85% de CTX-M-2 em 44 isolados de *A. baumannii* MDR de pacientes hospitalizados em um hospital universitário.

No Brasil existe apenas um relato de *A. baumannii* produtor de CTX-M-15, reportado recentemente por Zago e cols (2016), a ESBL foi detectada em duas amostras provenientes de urina e secreção traqueal no ano de 2009 e em duas amostras de hemocultura em 2011 e swab retal em 2014, todas de pacientes hospitalizados em UTI de dois hospitais de Maringá/Paraná. O primeiro relato de CTX-M-15 no Brasil ocorreu em isolados de *E. coli* de um hospital de São Paulo em 2010 (SEKI, 2013).

1.2.2. Alteração da permeabilidade da membrana externa

A membrana externa dos Gram-negativos é composta por fosfolipídio e lipopolissacarídeos, moléculas de proteínas de estrutura trimétrica, conhecidas como porinas ou proteínas de membrana externa (OMP), cruzam a estrutura interna da membrana formando canais de transporte que permitem a difusão de substâncias hidrofílicas, por onde passam alguns antibióticos e pequenos nutrientes (VILA, 2007). *Acinetobacter baumannii* apresenta permeabilidade diminuída da membrana externa, por apresentarem menor número e tamanho de porinas comparadas aos demais Gram-negativos, o que explica parte da resistência a vários antibióticos (VILA, 2002).

A resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* pode ser mediada por vários mecanismos, incluindo a impermeabilidade devido à perda de uma das suas principais porinas como, por exemplo, carO, OprD e OMP33-36 kDa (PELEG, 2008).

Alterações da membrana externa decorrentes da diminuição de proteína de 33-36 kDa foram mostradas por Costa e cols (2000), esses isolados apresentavam resistência para imipenem e meropenem. Em 2002, Limansky e cols associaram a diminuição da proteína de 29 kDa, denominada CarO, em isolados clínicos de *Acinetobacter* com a resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos. Outra proteína associada com a passagem dos antimicrobianos carbapenêmicos pela membrana externa é a proteína de 43 kDa (homóloga a OprD de *P. aeruginosa*) essa porina está ligada com a entrada do imipenem no interior da célula por meio de um canal eletrostático que atrai substâncias carregadas negativamente (FERNADEZ-CUENCA, 2003; BISWAS, 2007), o que também é descrito no estudo realizado por Mostachio e cols (2012), que apresentam a relação entre a resistência aos carbapenêmicos associada a diminuição ou ausência de proteínas de membrana externa.

Estudos prévios contraditórios mostram que a resistência ao imipenem e meropenem podem não estar relacionadas com a ausência da OprD homóloga (SMANI, 2013) como, por exemplo, o estudo de Catel-Ferreira e cols (2012) onde foram testadas cepas selvagens e mutantes de *A. baumannii* apresentando os mesmos valores de CIM para os carbapenêmicos. Isto sugere que apenas a perda de OprD em *A. baumannii* não é suficiente para aumentar as CIMs de carbapenêmicos.

1.2.3. Efluxo do antimicrobiano

O mecanismo de efluxo é expresso em todas as células com a função de protegê-las de componentes tóxicos. O aumento da expressão desse mecanismo tem sido associado a bactérias multirresistentes (VILA, 2007). O sistema de expulsão necessita de gasto de energia pela bactéria, porém, não ocasiona nenhuma alteração ou degradação da droga (KUMAR, 2005).

O primeiro sistema de efluxo descrito em *Acinetobacter* spp. foi o AdeABC, esse complexo pertence à família RND e confere resistência a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, cefotaxima, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, trimetropim e tigeciclina (COYNE, 2011), esse sistema de efluxo é regulado por um sistema denominado AdeRS (MARCHAND, 2004; OPAZO, 2009; COYNE, 2011). Huang e cols (2008) investigaram isolados multirresistentes não relacionados geneticamente, sendo uma delas produtora de OXA-23, na cepa não produtora dessa carbapenemase foi determinado que o fenótipo de resistência era devido somente a hiperexpressão da bomba AdeABC. O mesmo foi demonstrado em 2005 por Héritier e cols, onde uma cepa com mutação no gene regulador da expressão da bomba AdeABC levou a hiperexpressão da mesma causando diminuição da CIM de imipenem e meropenem. Outros dois sistemas da mesma família RND, também são relatados em *A. baumannii* como responsáveis pelo efluxo de antimicrobianos, o sistema AdeFGH tem cloranfenicol, clindamicina, fluoroquinolonas, trimetoprim, tetraciclinas, tigeciclina e sulfonamida como substratos, e o sistema de efluxo AdeIJK, β-lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, fluoroquinolonas, ácido fusídico, novobiocin e trimetoprim, regulados, respectivamente, pelos sistemas AdeL e AdeN (YOON, 2013).

1.2.4. Alteração do sítio de ligação da droga

O sítio de ação dos β-lactâmicos é uma enzima denominada proteína ligadora de penicilina (PBP) presente na membrana citoplasmática, estas enzimas catalisam a síntese do peptidoglicano, o principal componente da parede celular bacteriana (SAUVAGE, 2008).

PBPs com baixa afinidade a β-lactâmicos já foram descritas anteriormente, podendo sofrer alterações por mutação ou produção de PBPs suplementares (LIVERMORE, 1991; GEHRLEIN, 1991). Cayô e cols (2011) mostraram em seu estudo a presença de sete genes em isolados de *A. baumannii* que codificam PBP1a, PBP1b, PBP2, PBP3, PBP5/6, PBP6b, PBP7/8, essas cepas foram isoladas em 1950, mostrando que os genes de PBP são altamente conservados em todas as cepas de *A. baumannii* analisadas. As poucas mutações observadas não poderiam estar associadas com a resistência a carbapenêmicos, uma vez que foram encontrados em ambas cepas sensíveis e resistentes.

Contudo, alguns autores afirmam que cada antimicrobiano β-lactâmico possui uma maior afinidade com uma determinada PBP (BUIJS, 2008), e que a resistência do *A. baumannii* aos antimicrobianos carbapenêmicos pode estar associada a diminuição da expressão de PBP2 (GIAMARELLOU, 2008).

1.2.5. Alteração do lipopolissacarídeo

Embora já foram descartados devido à sua neurotoxicidade e nefrotoxicidade, as polimixinas têm uma atividade antibacteriana mais eficaz contra a maioria dos patógenos Gram-negativos, incluindo *A. baumannii* (LANDMAN, 2008).

As polimixinas são um grupo de peptídeos policatiônicos cíclicos que atuam principalmente sobre a membrana externa dos Gram-negativos levando a rápida alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática e consequentemente a morte celular (CLAUSELL, 2007).

A interação das polimixinas com o complexo da membrana externa de Gram-negativos ocorre inicialmente por atração eletrostática da droga com a porção do lipídio A do LPS (HANCOCK, 1999). As polimixinas ligam-se ao LPS deslocando Mg^2 e rompendo as pontes cruzadas entre Mg^2 e moléculas aniônicas do LPS, levando a desestruturação e ruptura das membranas externas e internas (CLAUSELL, 2007).

A alteração da carga elétrica do LPS, ocorre pelo sistema de dois componentes, este sistema é constituído por duas proteínas, uma proteína sensor de histidina quinase, que a estímulos ambientais sofre auto fosforilação ativando uma proteína citoplasmática por reação de transfosforilação, que promove ativação ou repressão dos genes alvo (GOODERHAM, 2009).

Estudos prévios de resistência à colistina por *A. baumannii* relatam a resistência por perda completa do LPS (MOFFATT, 2010) ou mutação no lócus *pmr* (ADAMS, 2009; ARROYO, 2011). No operon *pmr*CAB, o gene *pmr*B é o sensor de histidina quinase e o gene *pmr*A é a proteína reguladora, esse sistema controla a expressão do gene *pmr*C, responsável pela codificação da fosfoetanolamina, a adição de porções de fosfoetanolamina ao lipídeo A do LPS reduz a carga negativa da membrana bacteriana, e assim diminui a ligação da colistina carregada positivamente ao lipídio A, promovendo a resistência bacteriana (BECEIRO, 2011).

No entanto, a ausência total do LPS bacteriano, relatada como mecanismo de resistência as polimixinas em *A. baumannii*, é devido a mutações espontâneas nos genes codificadores de lipídio A como, *lpxA, lpxC* ou *lpxD* (MOFFATT, 2010).

As mutações no gene que codifica LpsB uma glicosiltransferase envolvida na biossíntese do core de LPS também têm sido implicados na resistência a polimixinas (HOOD, 2013).

1.3. Teste *in vitro* de combinações antimicrobianas

O uso combinado de antimicrobianos é uma prática comum no tratamento de infecções graves, tanto de origem comunitária como hospitalar, e tem sido investigada a fim de aumentar a eficácia dos tratamentos (PELEG, 2008).

Uma das técnicas utilizada para avaliação do sinergismo é a técnica do tabuleiro, conhecida como *checkerboard*, baseada na avaliação das CIM das drogas sozinhas e em combinação por meio de cálculos que determinam o efeito da combinação (YOON, 2004). Outro método descrito para avaliação do sinergismo antimicrobiano é o tempo de morte (*time-kill*) que avalia a atividade bactericida da droga obtendo dados de potência em função do tempo, essa avaliação ocorre em diferentes intervalos de tempo do ensaio (BONAPACE, 2000).

O sinergismo ocorre quando a atividade de dois antimicrobianos, dados conjuntamente, é superior ao efeito dos dois, individualmente, podendo ocorrer mesmo quando há resistência aos antimicrobianos individualmente, pois o conceito implica em aumento de potência microbiológica da combinação, e não de cada agente individualmente. Define-se antagonismo quando há prejuízo à atividade dos antimicrobianos e indiferença quando a adição de antimicrobianos não altera o desempenho das drogas isoladamente (RYBAK, 1996). A Figura 2 representa esquematicamente as definições acima relatadas.

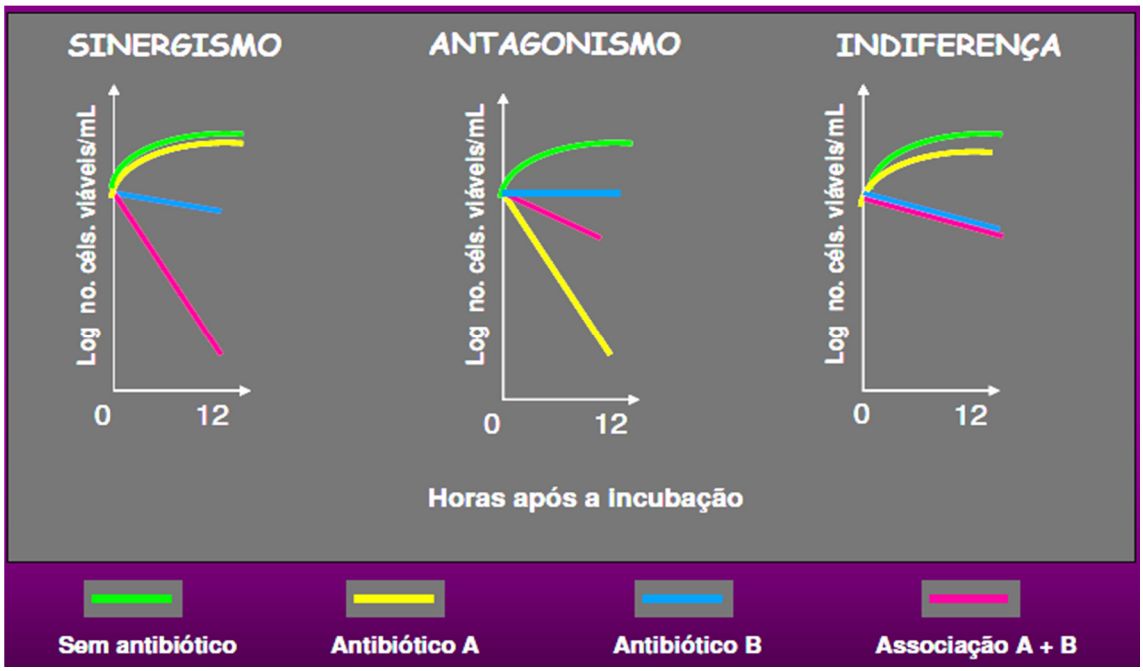


Figura 2. Definições esquematizadas dos efeitos das combinações antimicrobianas. FMUSP, São Paulo

Os estudos *in vitro*, entretanto, são questionáveis. Não há até o momento critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ou do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) que definam a metodologia das combinações e a correlação dos achados *in vitro* e *in vivo* são controversas (ZUSMAN, 2013; FAN, 2016). Vários fatores podem interferir na correlação do resultado *in vitro* com a resposta terapêutica. A farmacocinética das drogas utilizadas na terapia combinada, por exemplo, pode interferir negativamente nessa correlação. A concentração de cada uma das drogas no ser humano é variável, mas nos estudos *in vitro* estas proporções são mantidas fixas. Além disto, as características da infecção e do paciente também podem

interferir no resultado da combinação (RYBAK, 1996). O efeito sinérgico também pode estar relacionado com os mecanismos de resistência presente no isolado em estudo, sendo necessário a avaliação de cada isolado (BONAPACE, 2000).

O termo *checkerboard* refere-se ao padrão formado por múltiplas diluições dos dois agentes antimicrobianos a ser testados, em concentrações iguais, acima, e abaixo das suas CIMs contra os organismos em questão (PILLAI, 2005). Essa é a técnica mais utilizada para avaliação das combinações antimicrobianas por ser de fácil execução e interpretação. O método é vantajoso por permitir o teste de várias combinações em diferentes concentrações dos dois antimicrobianos, utilizando pequenos volumes dos mesmos, porém esse método só avalia a atividade inibitória e não a atividade bactericida (PILLAI, 2005).

Uma variedade de métodos para interpretar os resultados do teste de tabuleiro pode ser usada, porém estes métodos podem conduzir a diferentes resultados e conclusões. Entre eles estão a concentração inibitória fracional (CIF) e o método de *two-well* (PILLAI, 2005).

Bonapace e cols (2002) mostraram o uso de diferentes métodos para interpretar os resultados por tabuleiro, de acordo com o autor o método de CIF comparado com o teste de *time-kill* apresenta 40% de concordância, enquanto o método de *two-well* apresenta 70%. A padronização de interpretação é fundamental para diminuir resultados divergentes.

Também utilizado para avaliar as combinações antimicrobianas, o *time-kill* fornece dados para avaliação da atividade bactericida dos antimicrobianos indicando o tempo da interação da droga baseado na contagem de colônias por meio de semeaduras seriadas, é considerado padrão-ouro para avaliação das combinações antimicrobianas (PILLAI, 2005).

1.3.1. Combinação antimicrobiana contra *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii vem apresentando altos índices de resistência a diferentes antimicrobianos, o que dificulta em muito o tratamento de doenças causadas por esse agente. Nos últimos anos alguns estudos avaliaram o efeito sinérgico de antimicrobianos contra esse patógeno por meio de diferentes métodos como *checkerboard*, E-test e *time-kill* e demonstraram que o sinergismo entre as drogas foi bastante variável e que

resultados discordantes foram encontrados quando mais de uma metodologia foi utilizada (LIM, 2008; SHENG, 2011).

Outro achado interessante foi o sinergismo encontrando em combinações com glicopeptídeos, que não tem ação contra *Acinetobacter* spp (GORDON, 2010b; WAREHAM, 2011; SHIELDS, 2011).

Gordon e cols (2010b) estudaram a atividade da vancomicina e da colistina em combinação contra cinco cepas de *A. baumannii* por meio do método de *checkerboard*, de acordo com esses autores o poder de permeabilidade da colistina poderia facilitar a penetração do glicopeptídeo através da membrana externa e expor o sítio alvo da parede celular. No entanto, o sinergismo foi identificado em apenas quatro das seis amostras analisadas. O mesmo foi afirmado por Wareham e cols (2011) que obtiveram efeito sinérgico para os cinco isolados (100%) testados.

Shields e cols (2011) avaliaram combinações antimicrobianas pelos métodos de E-test, *checkerboard* e *time-kill* em um paciente transplantado tratado com tigeciclina e colistina, sem sucesso. O melhor resultado *in vitro* foi com a combinação entre colistina e doripenem usando método de *checkerboard*.

A avaliação da vancomicina também foi observada em um estudo mais recente, onde pacientes pediátricos foram tratados com combinações de colistina-vancomicina e meropenem, as mesmas combinações também foram avaliadas *in vitro*, mostrando o potencial de atividade sinérgica de uma estratégia terapêutica incluindo colistina e vancomicina e fornece novas informações clínicas importantes para seu uso potencial como uma opção terapêutica contra infecções de *A. baumannii* MDR (CECCARELLI, 2015).

Moland e cols (2008), investigaram a atividade da tigeciclina sozinha e em combinação com amicacina e polimixina B contra 3 de 170 isolados de *A. baumannii*, pelo método de *time-kill*, o qual apresentou melhor resultado bactericida para as drogas em combinação quando usadas sozinhas.

A tigeciclina também foi avaliada em combinação com diferentes antimicrobianos, o estudo de Principe e cols (2009) determinou apenas 5,9% de efeito sinérgico entre os isolados de *A. baumannii* MDR (n=22) tanto pelo método de *checkerboard* quanto *time-kill.* Park e cols (2016a) mostraram num estudo recente que as interações com tigeciclina apresentaram um alto efeito antagônico quando combinados com doripenem e colistina. Já no estudo de Tan e cols (2011), onde foi avaliado a combinação de tigeciclina com

polimixina B e rifampicina, o efeito sinérgico foi apresentado em 40% das combinações pelo método de *time-kill*, 17% pelo *checkerboard* e 2% pelo Etest contra os isolados de *A. baumannii*.

Outros estudos de terapia combinada contra isolados de *A. baumannii* envolvendo combinações similares aos do presente estudo estão apresentados na Quadro 3.

Vários estudos retrospectivos têm documentado menores taxas de mortalidade após infecção por *A. baumannii* MDR, quando usado a terapia combinada de antimicrobianos (BATIREL, 2014). Ainda não é claro se qualquer combinação específica de agentes proporcionaria benefício de sobrevivência para aqueles com infecção por *A. baumannii* MDR.

Desta forma, os estudos necessitam melhor padronização entre diferentes métodos *in vitro* para determinação de sinergismo antimicrobiano contra *A. baumannii,* assim como a padronização para os métodos de interpretação.

Quadro 3. Estudos com combinações antimicrobianas contra isolados de *Acinetobacter baumannii*. FMUSP, São Paulo.

Autor e cols	**Combinação Antimicrobiana**	**Pesquisa**	**Ano**
Hogg	Colistina e rifampicina	*In vitro*	1998
Montero	Colistina e rifampicina	*In vivo*	2004
Yoon	Polimixina B, imipenem e rifampicina	*In vitro*	2004
Fulnecky	Amicacina e colistina	Relato de caso	2005
Petrosillo	Rifampicina, ampicilina/sulbactam e colistina	Relato de caso	2005
Motaouakkil	Rifampicina e colistina	Ensaio clínico	2006
Timurkaynak	Rifampicina, meropenem, azitromicina, doxiciclina com colistina	*In vitro*	2006
Biancofiore	Meropenem, rifampicina e colistina	Relato de caso	2007
Pantopoulou	Colistina e rifampicina	*In vivo*	2007
Pankuch	Meropenem e colistina	*In vitro*	2008
Bassetti	Rifampicina e colistina	Relato de caso	2008
Song	Colistina e rifampicina	Relato de caso	2008
Lee	Meropenem, sulbactam e colistina	*In vitro*	2008
Arroyo	Tigeciclina e colistina	*In vitro*	2009

continua

Quadro 3. Estudos com combinações antimicrobianas contra isolados de *Acinetobacter baumannii*. FMUSP, São Paulo. (conclusão)

Autor e cols	**Combinação Antimicrobiana**	**Pesquisa**	**Ano**
Rodriguez	Colistina, imipenem e rifampicina	*In vitro*	2010
Sopirala	Tigeciclina, imipenem e amicacina	*In vitro*	2010
Pongpech	Colistina, imipenem e sulbactam	*In vitro*	2010
Pachon-Ibanez	Colistina e rifampicina	*In vitro* e *In vivo*	2010
Dizbay	Tigeciclina e colistina	*In vitro*	2010
Candel	Tigeciclina, meropenem e colistina	Relato de caso	2010
Ozbek	Colistina e tigeciclina	*In vitro*	2010
Hornsey	Colistina, vancomicina e teicoplanina	*In vivo*	2011
Liang	Colistina e minociclina	*In vitro*	2011
Santimaleeworagun	Colistina, fosfomicina, imipenem e sulbactam	*In vitro*	2011
Sheng	Tigeciclina e colistina	*In vitro*	2011
Peck	Imipenem, rifampicina, tigeciclina	*In vitro*	2012
O´Hara	Vancomicina, colistina e doripenem	*In vitro*	2013
Lee	Colistina e rifampicina	*In vitro*	2013
Ni	Tigeciclina, colistina e subactam	*In vitro*	2013
Majewski	Rifampicina e imipenem	*In vitro*	2014
Sun	Meropenem e rifampicina	*In vitro* e *In vivo*	2014
Dong	Rifampicina, colistina, sulbactam e tigeciclina	*In vitro*	2014
Percin	Colistina, vancomicina, netilmicina e sulbactam	*In vitro*	2014
Le Minh	Colistina, imipenem, meropenem, ceftazidima e ceftriaxona	*In vitro*	2015
Vourli	Colistina e meropenem	*In vitro*	2015
Park	Colistina, tigeciclina e doripenem	*In vitro*	2016a
Bae	Colistina e diferentes antimicrobianos	*In vitro*	2016

1.4. Justificativa do estudo

Acinetobacter baumannii é um dos patógenos mais frequentemente isolados de infecções nosocomiais principalmente nas UTI no Brasil, sua resistência a antimicrobianos vem aumentando nas últimas décadas e as opções para o tratamento dessas infecções são restritas. Recentemente, isolados resistentes a todas as drogas, incluindo as polimixinas, foram descritos na literatura. No HC-FMUSP, no ano de 2011, ocorreu um surto de infecção por *A. baumannii* resistente a todos os antibióticos. A avaliação das combinações antimicrobianas e mecanismos de resistência às polimixinas pode ser útil para terapia contra esse agente, exigindo assim uma padronização das técnicas *in vitro*. Assim como, a avaliação da virulência de isolados resistentes ás polimixinas pode ser útil para compreensão da patogênese desse patógeno.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Principais

- Avaliar o efeito das combinações antimicrobianas *in vitro,* contra isolados de *Acinetobacter baumannii* multidrogas resistentes.
- Avaliar os efeitos das combinações antimicrobianas determinadas *in vitro* contra isolados de *A. baumannii* com diferentes mecanismos de resistência

2.2. Objetivos Secundários

- Identificar mecanismos de resistência aos antimicrobianos por meio do sequenciamento total dos isolados.
- Identificar o mecanismo de resistência de *Acinetobacter baumannii* à colistina.
- Identificar genes com função de virulência por meio do sequenciamento total dos isolados.
- Identificar as sequências multilocus de todos os isolados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados bacterianos

Foram obtidos 20 isolados de *Acinetobacter baumannii* do banco de cepas do Laboratório de Investigação Médica – 54 (LIM-54). Treze isolados sensíveis a colistina foram selecionadas com base na clonalidade, buscando amostras com diferentes perfis clonais, e quanto aos mecanismos de resistência a carbapenêmicos estudados previamente (MOSTACHIO, 2012). Sete isolados resistentes a colistina foram selecionados com base nas CIM. Todos previamente identificados pelo método manual API20NE (bioMérieux, França), com leituras de 24 e 48 horas e por detecção do gene $bla_{\text{OXA-51}}$.

Os isolados foram provenientes de pacientes atendidos no HC-FMUSP, sendo as amostras sensíveis a colistina entre o período de junho de 2002 a dezembro de 2004, e as amostras resistentes a colistina entre o período de julho de 2011 a janeiro de 2012. Os dados utilizados para seleção das amostras estão apresentados na Tabela 1.

3.2. Cultivo e armazenamento

Os isolados estavam armazenados a -80^{0}C, para preservação celular, em caldo BHI (Brain Heart Infusion) acrescido de 20% de glicerol. As amostras foram cultivadas em ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas a 37° C por 24 horas no laboratório de bacteriologia do Instituto de Medicina Tropical.

Tabela 1. Dados prévios utilizados para seleção dos 20 isolados de *A. baumannii*. FMUSP, São Paulo.

ID	*Ano	Material Biológico	Local de Internação	CIM (µg/mL) colistina e carbapenêmicos			Genes de resistência a carbapenêmicos – PCR	Proteínas de Membrana Externa – SDS/PAGE			Perfil Clonal
				Col	Imi	Mero		29kDa	33-36 kDa	43kDa	
1	2002	Sangue	E1MH	2	256	64	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}	+++	+	+++	G
2	2002	Sangue	E1MH	2	32	128	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}	+	+	+++	E
3	2003	Sangue	UPSM	1	1	128	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}	+++	+	+++	F
4	2003	Sangue	UMIN	2	32	128	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}, $bla_{OXA-143}$	+	+	+	E
5	NI	Sangue	EICO	2	16	64	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}	+++	+	+++	H
6	2002	Sangue	EPSM	1	128	128	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}, $bla_{OXA-143}$; bla_{IMP}	+	+	Ausente	F
9	2003	Sangue	ETMO	0.5	128	64	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}; bla_{IMP}	+++	+	+++	G1
11	2004	Sangue	EMIN	0.5	64	16	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}, bla_{OXA-23}, $bla_{OXA-143}$	+	+	Ausente	I
13	2004	Sangue	EICO	0.5	64	32	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}, $bla_{OXA-143}$	Ausente	+	Ausente	E1
14	2004	Sangue	EICO	0.5	64	64	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}, $bla_{OXA-143}$; bla_{IMP}	+	+	+	D
15	2004	Sangue	U1MH	0.5	128	64	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}	+	+	+	I1
18	2004	Sangue	ECMG	1	16	16	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}, bla_{OXA-23}, $bla_{OXA-143}$	+++	+	+++	J
20	2004	Sangue	UQUE	0.5	128	128	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}, bla_{OXA-23}, $bla_{OXA-143}$	+	+	Ausente	K
22	2011	CVC	E1CH	**16**	32	32	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}	NI	NI	NI	NI
23	2012	Swab retal	U1CH	**16**	32	32	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}	NI	NI	NI	NI
24	2011	CVC	U1CH	**32**	32	32	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}	NI	NI	NI	NI
25	2011	Sangue	UCNV	**64**	64	32	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}	NI	NI	NI	NI
26	2011	Líq. Ascítico	U1CH	**32**	32	32	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}	NI	NI	NI	NI
27	2012	Sec. Traqueal	UNEU	**32**	64	16	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}	NI	NI	NI	NI
28	2011	Sangue	U1CH	**8**	32	16	IS*Aba1*+bla_{OXA-51}	NI	NI	NI	NI

ID: identificação dos isolados; *ano de coleta; CVC: cateter venoso central; Col: colistina; Imi: imipenem; Mero: meropenem; NI: Não Informado.

3.3. Cepas controle

Para todos os ensaios foram utilizadas cepas controle, de acordo com as normas padronizadas pelo CLSI, 2013 obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), como apresentado no Quadro 4.

Quadro 4. Cepas controle obtida da ATCC de acordo com os experimentos realizados. FMUSP, São Paulo.

Linhagem Controle		**Experimento**
Micro-organismo	**ATCC**	
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	CIM, Ágar Diluição, *Checkerboard*
Escherichia coli	ATCC 25922	CIM, Ágar Diluição, *Checkerboard*
Acinetobacter baumannii	ATCC 19606	PFGE, PCRq, Membrana Externa
Staphylococcus aureus	ATCC 29213	CIM

3.4. Antimicrobianos utilizados no estudo

Os antimicrobianos foram preparados considerando sua potência e a escolha foi baseada nas opções terapêuticas para tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* no HC-FMUSP, as drogas não utilizadas para o tratamento das infecções causadas pelo agente foram escolhidas com base na literatura a fim de avaliar o efeito sinérgico das mesmas. O sulbactam não foi selecionado para avaliação da combinação antimicrobiana, porém é objeto de estudo de outro projeto.

Para as combinações antimicrobianas foram escolhidas colistina (USP-Reference Standard Colistin Sulfate, Rockville, MD, USA) e imipenem (Tienam® 500, imipenem/cilastatina sódica - Merck Sharp Dohme, Whitehouse Station, NJ, EUA), por serem drogas de última opção terapêutica para tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*; e tigeciclina e fosfomicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) por não serem drogas de opções terapêuticas contra *A. baumannii*, porém promissoras para terapia

combinada. Os quatro antimicrobianos foram testados em combinação com as respectivas drogas: vancomicina, amicacina (Sulfato de Amicacina), gentamicina, rifampicina (Sigama-Aldrich, St Louis, MO, USA) e meropenem (Meronem® I.V. – AstraZeneca, Cotia, SP, Brazil).

A concentração final da solução estoque para cada antimicrobiano foi de 10.000 µg/mL. Para calcular a quantidade necessária do antimicrobiano foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Peso(mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração (µg/mL)}}{\text{Potência (µg/mg)}}.$$

As combinações antimicrobianas testadas para o método de *checkerboard* e *time-kill* estão apresentadas na Figura 3.

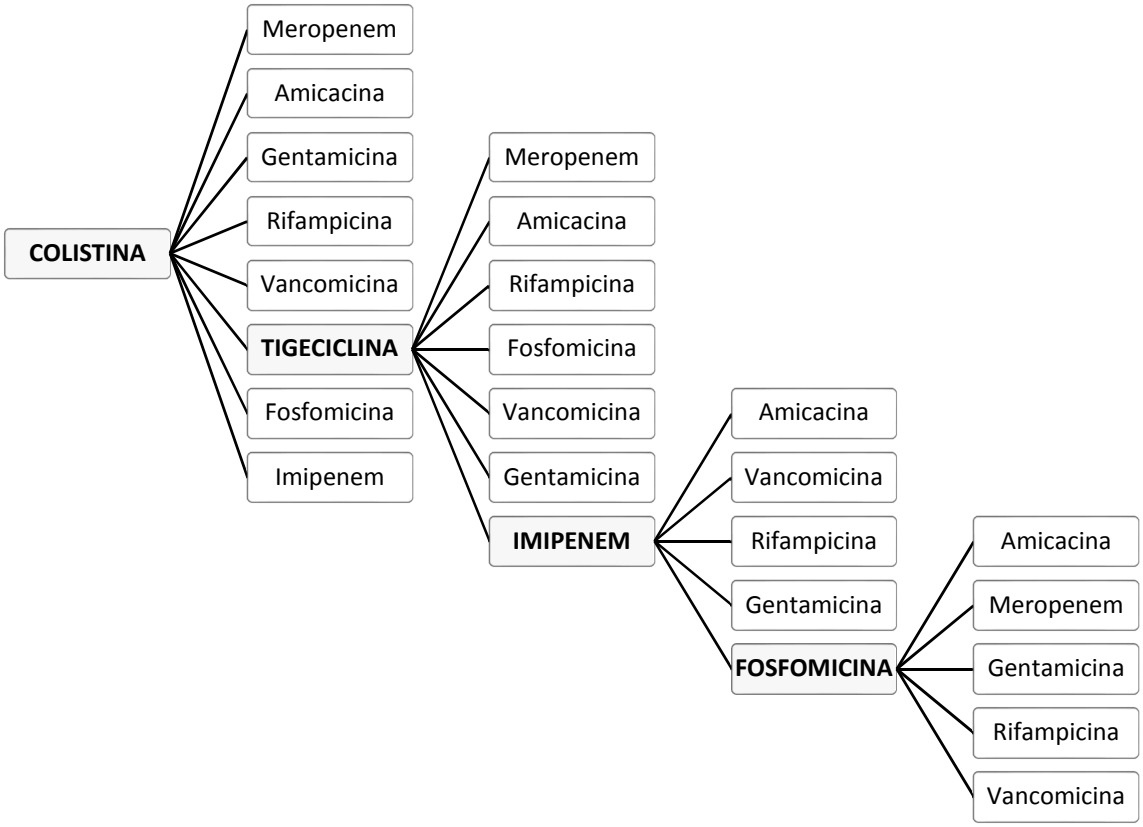


Figura 3. Diagrama das combinações antimicrobianas testadas no presente estudo contra isolados de *A. baumannii* multidrogas resistentes. FMUSP, São Paulo.

3.5. Determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo

As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas para todos os isolados, mesmo com resultados prévios, como análise confirmatória, pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as normas padronizadas pelo CLSI, 2013.

Cada antimicrobiano foi preparado considerando sua potência, assim como o solvente e o diluente apropriado para cada droga utilizada de acordo com as normas do CLSI.

3.5.1. Preparo das diluições em microplacas

A partir da solução estoque foram feitas diluições, com o diluente adequado, para obter a concentração inicial desejada. Todos os ensaios foram feitos em duplicata em diferentes períodos de tempo.

Sendo assim, 50 µL do meio de cultura Caldo Müeller Hinton Cátion Ajustado (CMHCA) foi colocado em todos os poços da placa de microdiluição com fundo arredondado de 96 poços, exceto na primeira coluna, 100 µL do antimicrobiano preparado a uma concentração acima, da concentração inicial desejada na placa, foi colocado na primeira coluna de A a H. Com pipeta multicanal foi realizada uma diluição seriada do antimicrobiano, sendo pipetado 50 µL do volume da primeira coluna e passado para os poços das colunas seguintes com homogeneização em todos os poços para cada coluna até a coluna 10, deixando os 50 µL restantes na coluna 12, o qual foi designado como controle de esterilidade, onde não foi colocado suspensão bacteriana para verificar a ocorrência de contaminação durante a diluição e preparo da droga.

3.5.2. Preparo da suspensão bacteriana

Foi preparado uma suspensão bacteriana na escala 0.5 de McFarland (~1.8×10^8 UFC/mL) por espectrofotometria com densidade óptica de 0.08 a 0.1 em comprimento de onda de 625nm, essa suspensão foi diluída a 1:100 em CMHCA (~1.8×10^6 UFC/mL). O mesmo foi realizado para as amostras controle.

3.5.3. Inoculação da suspensão bacteriana

Foi adicionado 50 µL da suspensão bacteriana em todos os poços da placa exceto na coluna 12 designada para controle de esterilidade, contendo apenas CMHCA e antimicrobiano em teste, enquanto a coluna 11 foi designada para controle de crescimento. Após inoculação as placas foram fechadas, homogeneizadas cuidadosamente, e incubadas a 35 ± 2°C por 18 a 24 horas.

3.5.4. Leitura das concentrações inibitórias mínima

A leitura das placas para determinação das CIMs foi realizada com auxílio de um espelho para leitura de microplacas em local iluminado, de acordo com a observação macroscópica do crescimento bacteriano.

Os pontos de corte utilizados para os antimicrobianos na CIM, foram baseados em critérios estabelecidos pelo CLSI (Quadro 5) para *A. baumannii*, exceto para vancomicina que foi utilizado ponto de corte baseado nos critérios para *Staphylococcus aureus.*

Quadro 5. Pontos de corte dos antimicrobianos utilizados para determinação da CIM de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2013). FMUSP, São Paulo.

ATB	**Cepas Controle – ATCC (µg/mL)**		
	***P. aeruginosa* (27853)**	***E. coli* (25922)**	***S. aureus* (29213)**
Colistina	0.5-4	0.25-2	-
Imipenem	1-4	0.06-0.25	-
Meropenem	0.25-1	0.008-0.06	-
Tigeciclina	0.03-0.25	-	0.03-0.25
Gentamicina	0.5-2	0.25-1	-
Amicacina	1-4	0.5-4	-
Rifampicina	16-64	4-16	-
Vancomicina	-	-	0.5-2
***Fosfomicina**	2-8	0.5-2	-

*valores para ágar diluição

Os critérios de sensibilidade aos antimicrobianos foram baseados no CLSI (2013) para *A. baumannii* com exceção da vancomicina e rifampicina, que foram usados critérios para *Staphylococcus aureus* e para fosfomicina, usado critério para *Enterobacteriaceae* estabelecidos pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2013), os mesmos estão apresentados no Quadro 6.

Quadro 6. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos estabelecidos pelo CLSI e EUCAST. FMUSP, São Paulo.

ATB	**Perfil de sensibilidade (µg/mL)**		
	Sensibilidade	**Resistência Intermediária**	**Resistência**
Colistina	≤2	-	≥4
Imipenem	≤4	8	≥16
Meropenem	≤4	8	≥16
Tigeciclina	≤2	4	≥8
Gentamicina	≤4	8	≥16
Amicacina	≤16	32	≥64
Rifampicina[a]	≤1	2	≥4
Vancomicina[a]	≤2	4 – 8	≥16
Fosfomicina[b]	≤32	-	>32

[a]Critérios estabelecidos pelo CLSI (2013) para *Staphylococcus aureus,* [b]Critérios estabelecidos pelo EUCAST (2013) para *Enterobacteriaceae.*

3.6. Ágar diluição

A concentração inibitória mínima para a fosfomicina de todos os isolados foi determinada pelo método de diluição em ágar. O procedimento foi realizado segundo normas do CLSI (2013) submetendo um inóculo bacteriano de concentração padronizada a concentrações crescentes de antimicrobiano, verificando o crescimento visível do micro-organismo após 20 a 24 horas de incubação em estufa a 35 ± 2 °C. O controle foi realizado utilizando-se as cepas de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Foram considerados os critérios de interpretação CIM para enterobactérias estabelecidos pelo EUCAST (Quadro 6) e o ponto de corte para cepas referências pelo CLSI (Quadro 5).

3.6.1. Preparo das placas em concentrações seriadas

Foram feitas as diluições seriadas em tubos falcon, a partir da solução-estoque de fosfomicina, em soro fisiológico a 0.9%, também foi preparado uma solução de D-glicose-6-fosfato (G-6-P) para uma concentração final de 25 µg/mL. Alíquotas de 17 mL de ágar Mueller-Hinton foram preparadas com 10% menos água, autoclavadas e mantidas em banho-maria à temperatura de 45 a 50 ºC. O ágar liquefeito (17 mL), a fosfomicina diluída nas respectivas concentrações (2 mL) e a solução de G-6-P (1 mL) foram homogeneizados completamente e distribuídas em placas de Petri descartáveis de 90 × 15 mm, previamente identificadas de acordo com a concentração, obtendo-se uma camada de ágar de 3 a 4 mm de espessura. Após a solidificação do ágar à temperatura ambiente as placas foram embaladas em filmes plásticos e armazenadas em geladeira à temperatura de 2 a 8 ºC, sendo utilizadas em até 72 horas.

3.6.2. Preparo da suspensão bacteriana

O inóculo dos isolados e das cepas controle, foi preparado em suspensão direta, com solução salina, de colônias isoladas selecionadas da placa de ágar sangue de carneiro 5% de 18 a 24 horas. A suspensão foi ajustada com auxílio de um espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm para que sua turbidez coincidisse com a da solução padrão 0.5 de McFarland, que contém aproximadamente 1.8×10^8 UFC/mL. Os inóculos foram diluídos 1:10 em solução salina esterilizada para obter uma concentração de aproximadamente 10^7 UFC/mL.

3.6.3. Aplicação da suspensão bacteriana na placa

Os inóculos bacterianos (10^7 UFC/mL) foram distribuídos em alíquotas de 100 µL em placa de fundo reto com 96 poços, possibilitando a aplicação rápida e simultânea na superfície do ágar.

As placas de ágar foram marcadas para orientar os pontos de inóculo. A inoculação nos meios foi realizada utilizando o multi-inoculador de Steer, aplicador contendo 32 pinos com pontas de 3mm que aplicam 2 a 3 µL de suspensão bacteriana a superfície do ágar, assim, o inóculo final em ágar teve aproximadamente 10^4 UFC por pino.

Primeiramente foi inoculada uma placa de controle do crescimento (sem antimicrobiano), a seguir, começando pela concentração mais baixa, foram inoculadas as placas contendo as diferentes concentrações de antimicrobiano. Por último, foi inoculada uma placa de controle de esterilidade para verificar possível contaminação ou transferência significativa de antimicrobiano durante a inoculação.

As placas inoculadas permaneceram à temperatura ambiente até que a umidade nos pontos de inoculação tivesse sido absorvida, no máximo por 30 min. Em seguida foram invertidas e incubadas em estufa a 35 ±2 ºC por 20 a 24 horas.

3.6.4. Leitura da concentração inibitória mínima por ágar diluição

As placas foram colocadas numa superfície escura, não refletiva. A CIM foi registrada como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento, descartando qualquer colônia ou turvação leve causada pelo inóculo.

3.7. Determinação da concentração inibitória mínima da fosfomicina por microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima para fosfomicina, de todos os isolados, foi também determinada pelo método de microdiluição em caldo para padronização do método de *checkerboard*.

O antimicrobiano foi preparado considerando sua potência, assim como o solvente e o diluente apropriado para a droga utilizada de acordo com as normas do CLSI para ágar diluição.

3.7.1. Preparo das diluições em microplacas

A partir da solução estoque do antimicrobiano, foram feitas diluições com o diluente adequado, para obter a concentração inicial quatro vezes acima da desejada pois, foi

adicionado G-6-P em cada poço. Todos os ensaios foram feitos em duplicata em diferentes períodos de tempo.

Sendo assim, 50 µL de meio de cultura CMHCA foi colocado em todos os poços da placa de microdiluição com fundo arredondado de 96 poços, exceto na primeira coluna, onde 100 µL do antimicrobiano preparado, com concentração quatro vezes acima da concentração inicial da placa, foi colocado na coluna 1 de A a H. Com pipeta multicanal foi realizada uma diluição seriada do antimicrobiano, sendo pipetado 50 µL do ATB da primeira coluna e passado para os poços das colunas seguintes com homogeneização em todos os poços de cada coluna até a coluna 10, deixando os 50 µL restantes na coluna 12, o qual foi designado como controle de esterilidade, onde não foi colocado suspensão bacteriana para verificar a ocorrência de contaminação durante a diluição.

Após a diluição da fosfomicina, 50 µL de solução G-6-P foi adicionado em todos os poços da placa, exceto na coluna 11 (controle de crescimento) para uma concentração final de 25 µg/L.

3.7.2. Preparo da suspensão bacteriana

Foi preparado uma suspensão bacteriana na escala 0.5 de McFarland (~1.8×10^8 UFC/mL) por espectrofotometria com densidade óptica de 0.08 a 0.1 em comprimento de onda de 625 nm, essa suspensão foi diluída a 1:100 em CMHCA (~1.8×10^6 UFC/mL). O mesmo foi realizado para as amostras controle.

3.7.3. Inoculação da suspensão bacteriana

Foi adicionado 100 µL da suspensão bacteriana diluída em todos os poços da placa exceto na coluna 12, designada para controle de esterilidade, já a coluna 11 contendo CMHCA e suspensão bacteriana foi designada para controle de crescimento. Após inoculação as placas foram fechadas, homogeneizadas, e incubadas a 35 ± 2 °C por 18 a 24 horas.

3.7.4. Leitura das concentrações inibitórias mínima

A leitura das CIMs foi realizada com auxílio de um espelho para leitura de microplacas em local iluminado, de acordo com a observação macroscópica do crescimento bacteriano.

Os pontos de corte e os critérios de sensibilidade foram os mesmos utilizados para o ágar diluição, apresentados nos Quadros 5 e 6.

Para confirmação dos resultados da CIM, também foi utilizado um leitor de placas (Absorbance Reader, Tecan – Sunrise).

3.8. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

A eletroforese convencional de moléculas de DNA é realizada aplicando-se amostras de preparados de DNA em uma matriz sólida de agarose e induzindo estas moléculas a migrar através do gel sob campo elétrico estático. A separação das moléculas através do gel depende predominantemente do peso molecular dos mesmos, num processo que utiliza campos elétricos que são ativados alternadamente (DURMAZ, 2009).

A técnica foi aplicada para os 20 isolados, mesmo para os isolados sensíveis a colistina, previamente selecionados de um estudo anterior com diferentes perfis moleculares.

3.8.1. Preparo da suspensão bacteriana

As amostras foram semeadas em ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas por 18-24 horas a 37 °C. Três a cinco colônias do crescimento foram inoculadas em 3 mL de caldo triptona de soja (TSB) e incubadas overnight a 150 rpm em shaker a 37 °C. Microtubos foram identificados e pesados. O volume do crescimento em TSB foi transferido para os microtubos pré-pesados, esses foram centrifugados por 20 minutos a 11.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de solução fisiológica estéril ao sedimento sendo homogeneizado com vórtex. O mesmo processo foi realizado por mais 3 vezes.

Após a última lavagem, foi retirado totalmente o sobrenadante e o microtubo foi pesado com o sedimento. Em seguida a massa bacteriana obtida foi calculada e preparada uma suspensão bacteriana na concentração de 100 µg/µL com EDTA 25 mM pH 8.0. A equalização do volume foi realizada subtraindo o peso do microtubo com sedimento pelo peso do microtubo vazio.

3.8.2. Preparo dos blocos de agarose

Após a fundição da agarose low melting a 2% em TBE 0.5 x (Tris, Ácido Bórico, EDTA), esta foi deixada no termo-bloco (AccuBlock Digital Dry Bath – Labnet International) a 56 °C, aquecido previamente. Microtubos, contendo 225 mL de tampão TEN (TRIS 1 M, EDTA 0.5 M, NaCl 4 M), foram identificados. A esse tampão foi adicionado 25 µL da suspensão bacteriana, os microtubos foram homogeneizados em vórtex e colocados no termo-bloco a 56 °C por 1 hora. Foi adicionado a suspensão 70 µL de lisozima a 20 mg/mL, em seguida adicionado 350 µL da agarose e homogeneizado com pipeta. A mistura foi distribuída nos moldes para os blocos e resfriados em geladeira por 30 minutos.

3.8.3. Extração do DNA bacteriano

Foram distribuídos 2 mL de tampão EC (EDTA 0.5 M, TRIS 1 M, NaCl, N-lauril-sarcosyl, BRIJ, Deoxicolato de Sódio) nos poços de uma placa de cultura de células de 24 poços, os blocos de agarose foram removidos dos moldes no tampão EC e incubados por 5 horas a 37 °C sob agitação suave (75 rpm). Em seguida foi retirado o tampão EC e adicionado 2 mL de tampão CHEF-TE (EDTA 0.5 M, TRIS-HCl 1 M), o mesmo foi retirado e adicionado novamente 2 mL deste tampão, que foi mantido a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período o tampão CHEF-TE foi descartado e adicionado 2 mL de tampão ES (EDTA 625 mM, N-lauril-sarcosyl 5%) acrescido de 100 µL de proteinase K a 20 mg/mL em cada poço e homogeneizado. As placas foram incubadas a 52 °C overnight.

Retirado o tampão ES os blocos foram lavados 5 vezes com 2 mL de CHEF-TE. A primeira lavagem não teve incubação, as demais foram feitas com intervalos de 60 minutos sob agitação leve (75 rpm). Após a última lavagem foi trocado o tampão CHEF-TE e as placas guardadas sob refrigeração (4 °C).

3.8.4. Restrição enzimática

Foi adicionado 200 µL de tampão DNS (TRIS 1 M, MgCl) nos poços de uma placa de 96 poços. Com auxílio de uma espátula e bisturi, um bloco de agarose foi cortado ao

meio e colocados no tampão DNS. Retirado o tampão DNS foram realizadas 5 lavagens com intervalos de 60 minutos cada. O tampão DNS foi substituído por 100 µL de tampão com enzima de restrição *ApaI* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA) e incubadas a 37 °C por 16 horas.

3.8.5. Preparo do gel de agarose e tampão TBE 0.5 x para eletroforese

Para o pente de 20 amostras, foram preparados 100 mL de agarose 1% com TBE 0.5 x, a percentagem de agarose é determinante para o tamanho dos fragmentos que se pretende separar. Os blocos, com DNA, assim como o peso molecular de 50-1000 bp (Lambda Ladder PFG Marker, Biolab, Austria, Europe - GMBH), foram colocados no pente e em seguida foi distribuído a agarose no molde sem formar bolhas e deixado solidificar. Foram preparados 2 litros de TBE 0.5 x, com 200 µL de tiuréia 0.5 M, o tampão foi colocado na cuba para refrigerar e as condições de corrida foram ajustadas com os dados contidos no Quadro 7. Após a corrida o gel foi corado em solução de brometo de etídio 1 µg/mL por 20 minutos e fotodocumentado em Alpha Innotech - AlphaImmage.

Quadro 7. Condições de corrida estabelecidas para PFGE de *A. baumannii* em CHEF DRIII – BioRad. FMUSP, São Paulo.

Agarose (%)	Switch Time (s)	Volts/ cm	Anglo	Tempo de Corrida	Temperatura	Fragmento (Kb)
1	1-30	6	120°	23 horas	13°C	<50-300

s: segundos

3.8.6. Interpretação do PFGE

Os perfis eletroforéticos gerados foram agrupados utilizando o *software* de bioinformática Bionumerics versão 7.1 (Applied Maths). Fragmentos de DNA foram manualmente curados e normalizados usando o peso Lambda Marker presente em cada gel. Uma tolerância de 1.5% e otimização de 0.5% foram utilizadas para a comparação

de diferentes géis (SEIFERT, 2005). O agrupamento de clusters foi realizado e gerado um dendrograma pelo método de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) e coeficiente Dice de similaridade.

Fragmentos de DNA das cepas representativas de isolados sensíveis de *A. baumannii* - ATCC 19606, foram incluídas na análise.

Para definir os perfis clonais e subtipos encontrados, três níveis de *cut off* foram seguidos: isolados com similaridade <80% foram considerados diferentes perfis. Os subtipos foram definidos a partir dos perfis com coeficiente Dice entre 80-95%. Isolados com similaridade >95% foram considerados idênticos (SEIFERT, 2005).

3.9. Avaliação das combinações antimicrobianas por *checkerboard*

O método de *checkerboard* é uma técnica usada para avaliar combinações de antimicrobianos *in vitro*. O *checkerboard* se refere ao padrão (de tubos ou poços de microdiluição) formado por várias diluições dos dois antimicrobianos sendo testado, em concentrações iguais, acima e abaixo de suas concentrações inibitórias mínimas contra os organismos que estão sendo testados. Cada poço da placa de microdiluição contém uma concentração única das duas drogas que estão sendo testadas (PILLAI, 2005).

3.9.1. Preparo das diluições dos antimicrobianos

Os antimicrobianos foram diluídos, a partir da solução estoque, em tubo falcon contendo 10 mL de CMHCA em concentrações 4 vezes acima da concentração desejada na placa, em seguida foi realizado uma diluição seriada com os demais falcons contendo 5 mL de CMHCA, em número correspondente as colunas e linhas da placa de microdiluição utilizadas para o método.

A técnica de *checkerboard* foi realizada para os 20 isolados em duplicata, contando com 25 combinações antimicrobianas por isolado.

3.9.2. Preparo das placas de *checkerboard*

Foram transferidos 50 µL dos antimicrobianos, previamente diluídos, em cada concentração, para placas de microdiluição estéreis com fundo arredondado, um dos

antimicrobianos foi distribuído na horizontal do mais concentrado, na coluna 10, até o menos concentrado, na coluna 2, um segundo antimicrobiano foi distribuído na vertical, sendo o mais concentrado da linha A até o menos concentrado na linha G, a última linha (H) e a primeira coluna (1) foi destinada somente para um dos antimicrobianos com o intuito de determinar o CIM de cada ATB na mesma placa, assim como, foram determinados na coluna 11 o controle de crescimento, contendo apenas CMHCA e suspensão bacteriana e na coluna 12 o controle de esterilidade, contendo apenas CMHCA e o volume da última diluição d ATB. Para as placas onde foram testados fosfomicina foram acrescentados 50 µL de G-6-P em todos os poços contendo fosfomicina.

3.9.3. Preparo da suspensão bacteriana

O inóculo, tanto dos isolados quanto dos controles, foi preparado fazendo-se uma suspensão direta, em solução salina, de colônias isoladas selecionadas numa placa de ágar sangue de carneiro a 5% com incubação de 18 a 24 horas. A suspensão foi ajustada com auxílio de um espectrofotômetro para turbidez de solução padrão 0.5 de McFarland, que contém aproximadamente 1.8 x 10^8 UFC/mL. Os inóculos foram diluídos 1:100 em CMHCA para obter uma concentração de 10^6 UFC/mL, 100 µL da suspensão bacteriana foi distribuído em todos os poços da placa, exceto na coluna 12, destinada ao controle de esterilidade. Para as placas onde foram testados fosfomicina o volume de suspensão bacteriana diluída foi de 50 µL em cada poço.

3.9.4. Leitura do *checkerboard*

A leitura do *checkerboard* foi realizada com auxílio de um espelho para leitura de microplacas em local iluminado, de acordo com a observação macroscópica do crescimento bacteriano.

3.9.5. Interpretação das combinações antimicrobianas

A interpretação do efeito sinérgico das combinações antimicrobianas foi realizada por meio de dois métodos diferentes, o método de *two-well* e CIF. O método de *two-well*

consiste na determinação de dois poços da placa contendo a combinação dos dois ATB em uma concentração única, para determinação dos poços foi realizado o cálculo:

1° Poço:
0.25 x CIM droga A e 0.25 x CIM droga B = poço com concentração específica de A+B
2° Poço:
2 x CIM droga A e 2 x CIM droga B = poço com concentração específica de A+B

Quando os dois poços, com as respectivas concentrações determinada pelo cálculo, não apresentam turvação é considerado sinergismo antimicrobiano, quando somente um dos poços apresentam turvação o resultado é considerado indiferente e a presença de turvação nos dois poços tem resultado antagônico (ELIOPOULOS, 1996; MARYMONT, 1981).

Para determinação do CIF foram calculadas:

$$CIF = CIF_A + CIF_B = \frac{CIM\ (droga\ A + droga\ B)}{CIM\ (droga\ A)} + \frac{CIM\ (droga\ B + droga\ A)}{CIM\ (droga\ B)}$$

Onde:

CIF_A = CIM da droga A em combinação dividido pelo CIM da droga A sozinha;

CIF_B = CIM da droga B em combinação dividido pelo CIM da droga B sozinha.

O sinergismo foi definido como CIF ≤ 0.5, indiferença como CIF >0.5 - <4 e antagonismo ≥ 4 (GORDON, 2010b).

3.10. *Time-kill*

Em contraste com a técnica de *checkerboard*, que normalmente fornece apenas dados inibitórios, a técnica de *time-kill* avalia a atividade microbicida da combinação testada. Por esta razão, muitas vezes é mais relevante para situações clínicas em que a terapia bactericida é desejável (PILLAI, 2005).

O estudo foi realizado em duplicata, em diferentes períodos de tempo, com os mesmos antimicrobianos utilizados para determinação do CIM e para técnica de *checkerboard*, seguindo protocolo modificado descrito por Sheng e cols (2011).

As concentrações utilizadas para o ensaio foram determinadas com base no CIM do método de *checkerboard*, sendo que foram testadas, para todos os isolados, concentrações referentes a 1 x CIM e 0.5 x CIM.

Para os isolados que apresentaram resultados indiferentes no método de *time-kill* assim como, para os isolados resistentes a colistina foram também testadas as concentrações de 4 x CIM, 2 x CIM, 0.25 x CIM e 0.125 x CIM.

3.10.1. Preparo do teste de *time-kill*

Para cada isolado foram realizados cinco tubos falcon, de 10 mL cada, contendo CMHCA juntamente com suspensão bacteriana na escala 0.5 de McFarland e os antimicrobianos nas concentrações do CIM pré-determinadas pelo método de *checkerboard*, onde, o 1° tubo apresentava a droga A sozinha, o 2° tubo apresentava a droga B sozinha, o 3° tubo apresentava a combinação da droga A e B nas concentrações de 1 x CIM, o 4° tubo apresentava a combinação da droga A e B na metade da concentração do CIM (0.5 x CIM) e o 5° tubo apresentava somente o isolado na presença de meio de cultura para determinação do controle de crescimento. Os tubos foram incubados a 37 °C, em shaker a 150 rpm, e nos períodos de 0 (momento do preparo, sem incubação), 2, 4, 6 e 24 horas uma alíquota de cada tubo foi diluída a 1:10, 1:100 e 1:1000 em salina, para cada diluição, 10 µL foram dispensados em placas de ágar Müller Hinton e semeados em três sentidos diferentes. As placas foram incubadas a 37 °C por 20-24 horas para contagem de colônias.

3.10.2. Interpretação do *time-kill*

O sinergismo foi interpretado como diminuição $\geq 2 \log_{10}$ na contagem de colônias da combinação de antimicrobianos quando comparados com o tempo 0 (primeiro período de incubação); o antagonismo foi considerado com aumento $\geq 2 \log_{10}$ na contagem de colônias e indiferente para aumento ou diminuição $<2 \log_{10}$ na contagem de colónias com a combinação (PETERSEN, 2006).

3.11. Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para determinação de genes de resistência a carbapenêmicos e proteínas de membrana externa. A caracterização genotípica das amostras de *A. baumannii* resistentes as polimixinas foram submetidas à PCR, para detecção de determinantes genéticos responsáveis pela biossíntese do LPS (*lpxA, lpxC, lpxD*) e do sistema regulatório PmrCAB (*pmrA, pmrB* e *pmrC*).

A extração do DNA genômico dos isolados bacterianos foi realizada por meio do kit de extração Ilustra Bacteria Genomic Prep Mini Spin Kit - GE® Healthcare, seguindo as orientações do fabricante.

As sequências especificas de DNA foram amplificadas por PCR, os pares de iniciadores, assim como suas respectivas temperaturas de anelamento estão apresentados no Quadro 8.

Cada reação foi realizada com controle interno positivo, para o determinado gene, e controle negativo. As reações de amplificação ocorreram em termociclador Mastercycler Nexus GSX 1. Os produtos amplificados pela PCR foram submetidos a eletroforese (gel de agarose 1%, coloração com Syber Safer) e fotodocumentado com Alpha Innotech – AlphaImager.

3.11.1. Amplificação dos genes de carbapenemases

A detecção dos genes codificadores de oxacilinases (OXA-51, OXA-23, OXA-58, OXA-24 e OXA-143) e metalo-β-lactamases (IMP, VIM, SIM, SPM e NDM) foi realizada para cada gene separadamente, de acordo com técnicas padronizadas por Mostachio e cols (2009) para PCR Multiplex nas seguintes condições: desnaturação 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, a temperatura de anelamento dos respectivos iniciadores por 45 segundos e 72 °C por 30 segundos, a extensão final foi realizada a 72 °C por 10 minutos.

3.11.2. Amplificação dos genes de proteína de membrana externa

A reação de amplificação dos genes *car*O e *omp*33-36 kDa foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 2 µL de DNA a 20 ng/µL adicionados de tampão 1 x,

$MgCl_2$ (1.5 mM), dNTP mix de 10 mM (150 µM), iniciadores foward e reverse de 10 µM (50 nM), Taq DNA Polimerase (1.5 U/µL) e água MiliQ estéril para completar o volume da reação. As condições para amplificação do gene *carO* foram: desnaturação 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 50 segundos, 53 °C por 40 segundos e 72°C por 50 segundos, a extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos. Para o gene de 33-36 kDa: desnaturação 95 °C por 7 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, a extensão final foi realizada a 72 °C por 10 minutos.

3.11.3. Amplificação dos genes da biossíntese do LPS e do sistema regulatório PmrCAB

A reação de amplificação dos genes da biossíntese do LPS (*lpxA, lpxC* e *lpxD*), e do sistema regulatório PmrCAB (*pmrA, pmrB* e *pmrC*), foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 3 µL de DNA a 20 ng/µL adicionados de tampão 1 x, $MgCl_2$ (1.5 mM), dNTP mix de 10 mM (200 µM), iniciadores foward e reverse de 10 µM (300 nM), Taq DNA Polimerase (2 U/µL) e água MiliQ estéril para completar o volume da reação. As condições para amplificação foram: desnaturação 94 °C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto, a extensão final foi realizada a 72 °C por 7 minutos.

Quadro 8. Sequência de oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento utilizadas no estudo. FMUSP, São Paulo.

Iniciador	Sequência de Oligonucleotídeos (5'-3')	T°	Tamanho (pb)	Referência
bla$_{OXA51}$ - F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	56	353	Woodford 2006
bla$_{OXA51}$ - R	TGGATTGCACTTCATCTTGG			
bla$_{OXA23}$ - F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	56	501	Woodford 2006
bla$_{OXA23}$ - R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT			
bla$_{OXA24}$ - F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	57	246	Woodford 2006
bla$_{OXA24}$ - R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT			
bla$_{OXA58}$ - F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	58	599	Woodford 2006
bla$_{OXA58}$ - R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC			
bla$_{OXA143}$ - F	AGTTAACTTTCAATAATTG	45	604	Higgins 2009
bla$_{OXA143}$ - R	TTGGAAAATTATATAATCCC			
bla$_{SPM}$ -F	CCTTTTCCGCGACCTTGATC	59	798	Mendes 2007
bla$_{SPM}$ - R	ATGCGCTTCATTCACGCAC			
bla$_{SIM}$ - F	GTACAAGGGATTCGGCATCG	58	569	Mendes 2007
bla$_{SIM}$ - R	GTACAAGGGATTCGGCATCG			
bla$_{IMP}$ -F	TTGGAAAATTATATAATCCC	47	188	Mendes 2007
bla$_{IMP}$ - R	CCAAACCACTAGGTTATC			
bla$_{VIM}$ - F	TTTGGTCGCATATCGCAAAG	60	382	Mendes 2007
bla$_{VIM}$- R	CCATTCAGCCCAGATCGGCAT			
bla$_{NDM}$ - F	GGCGGAATGGCTCATCACGA	60	375	Chen 2011
bla$_{NDM}$ - R	CGCAACACAGCCTGACTTTC			
33-36kDa - F	CATCGATGGCACTAACATGG	60	175	Mostachio 2009
33-36kDa - R	AGTGTGACCACCCCAAACAT			
*car*O - F	GGTTACGGTGGTGCTTTGTT	53	118	Mostachio 2009
*car*O - R	GGTGCGAAACCAAAACCTAA			
*lpx*A - F	TGAAGCATTAGCTCAAGTTT	50	102	Moffatt 2010
*lpx*A - R	GTCAGCAAATCAATACAAGA			
*lpx*D - F	CAAAGTATGAATACAACTTTTGAG	50	149	Moffatt 2010
*lpx*D - R	GTCAATGGCACATCTGCTAAT			
*lpx*C - F	TGAAGATGACGTTCCTGCAA	50	299	Moffatt 2010
*lpx*C - R	TGGTGAAAATCAGGCAATGA			
*pmr*A - F	ATGACAAAAATCTTGATGATTGAAGAT	50	235	Beceiro 2011
*pmr*A - R	TTATGATTGCCCCAAACGGTAG			
*pmr*B - F	GTGCATTATTCATTAAAAAAAC	50	145	Beceiro 2011
*pmr*B - R	TCACGCTCTTGTTTCATGTA			
*pmr*C - F	ATGTTTAATCTCATTATAGCCA	50	159	Beceiro 2011
*pmr*C - R	TTAGTTTACATGGGCACAA			
16S - F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55	152	Mendes 2007
16S - R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT			

T°**:** temperatura de anelamento; F: foward; R: reverse.

3.12. Avaliação das proteínas de Membrana Externa

Para avaliação do perfil de porinas dos isolados resistentes as polimixinas e carbapenêmicos, o extrato de proteínas de membrana externa foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). O método foi realizado para os sete isolados resistentes a colistina, uma vez que para os isolados sensíveis ao antimicrobiano os resultados foram adquiridos de estudo prévio (MOSTACHIO, 2009). Todos foram comparados com uma amostra padrão sensível (ATCC 19606) para três proteínas de diferentes pesos (29 kDa, 33-36 kDa e 43 kDa), seguindo o mesmo padrão do estudo anterior, onde a ausência ou até mesmo a diminuição da quantidade de proteína foi relacionada com a resistência aos carbapenêmicos.

3.12.1. Extração das proteínas de membrana externa

Os sete isolados foram cultivados overnight, em ágar sangue de carneiro a 5%, e foram subcultivadas, em duplicata, sendo em 45 mL de BHI e em 45 mL de BHI acrescido de colistina a 4 µg/mL e mantidas sob agitação (150 rpm) a 37 °C. Após incubação de 24 horas os subcultivos foram submetidos a centrifugação de 5.000 rpm por 15 minutos. O sedimento foi ressuspendido com tampão de fosfato sódico (PBS) a 10 mM pH 7,0 acrescidos com inibidor de protease fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF) a 1 mM. As células foram sonicadas em gelo por 3 ciclos de um minuto cada, com intervalo de um minuto de resfriamento entre cada ciclo com auxílio de um sonicador. Os restos celulares foram removidos por meio de centrifugação a 4.300 rpm por 15 minutos a 4 °C, ou pelo tempo necessário para que o sobrenadante se tornasse límpido. O sobrenadante foi transferido para tubos de ultra centrífuga (Ultracentrífuga Beckamm – L8 70M, USA) contendo 7 mL de PBS a 10 mM pH 7.0 acrescidos de PMSF a 1 mM e centrifugado a 30.000 rpm por 120 minutos para a coleta das frações de membrana. O sedimento resultante foi ressuspendido com 150 µL de PBS a 10 mM pH 7.0 acrescidos de PMSF a 1 mM. Tratou-se 100 µL dessa suspensão com 800 µL de sarcosil 2% e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Após centrifugação de 15.000 rpm por 60 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido com 50 µL de PBS a 10 mM pH 7.0 acrescidos com PMSF a 1 mM e mantidos sob refrigeração a 4 °C por 24

horas para solubilização das proteínas. Em seguida foi armazenado a -20 °C para posterior analise por SDS-PAGE.

3.12.2. Quantificação das proteínas de membrana externa

As proteínas de membrana externa foram quantificadas pela metodologia de Bradford com auxílio do reagente de Bradforf (BioAgency Laboratórios) por espectrofotometria a 595 nm (GeneQuant Pro, GE) e posteriormente tratadas com 2 µL ácido beta-mercapto-etanol para 10 µL de proteína. As proteínas foram levadas à fervura por 5 minutos com tampão de amostra (Tris-HCL 0.5 M, SDS 10%, glicerina 20% e azul de bromofenol 0.01%).

3.12.3. Preparo e corrida do SDS-PAGE

As proteínas foram aplicadas no gel de poliacrilamida de 12.5%, previamente fabricada (GE Healthcare), em uma concentração de 20 ng. A corrida foi realizada no aparelho Multiphor II (GE) a 600 volts, 50 mA e 30 W por aproximadamente 60 minutos. Os pesos moleculares utilizados como marcadores foram de 97.4 kDa (fosforilase B de musculo de ratos), 66.2 kDa (albumina sérica bovina), 45.0 kDa (albumina de ovo), 31.0 kDa (anidrase carbônica bovina), 21.51 kDa (inibidor de tripsina) e 14.4 kDa (lisozima).

Como controle foi utilizado a cepa *A. baumannii* ATCC 19606, conhecida como sensível a carbapenêmicos. Após a eletroforese o gel foi corado pelo kit PlusOne Silver Staining Kit, Protein (GE, Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Para interpretação foi analisado, visualmente, a intensidade das bandas onde foi considerado (+++) para a intensidade de banda igual a intensidade da cepa referência, (++) para intensidade uma vez menor que a cepa referência, (+) para intensidade duas vezes menores que a cepa referência e (++++) para intensidade maior que a cepa referência.

3.13. Sequenciamento do genoma total bacteriano por Ion Torrent PGM™

Para determinação dos genes com função de virulência, genes de resistência a antimicrobianos e para verificação de possíveis mutações genéticas desses genes foi

realizado sequenciamento genético total de seis isolados pela tecnologia Ion Torrent Personal Genome Machine™ (PGM) da Life Technologies segundo a metodologia descrita por Rothberg e cols em 2011. Os isolados foram selecionados com base no perfil molecular e dos diferentes níveis de CIM frente aos carbapenêmicos e colistina.

Foi utilizado um kit comercial para preparação das amostras e o aparelho de sequenciamento Ion Torrent do sistema de multiusuários da Faculdade de Medicina da USP.

A metodologia envolvida nesta análise genômica foi feita no Laboratório de Investigação Médica - 03 (LIM-03) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O processo envolve 3 etapas realizadas de acordo com o protocolo da empresa: preparo de biblioteca, PCR em emulsão e sequenciamento.

3.13.1. Preparo da biblioteca

Para o preparo da biblioteca foi realizado fragmentação enzimática do genoma previamente extraído por kit comercial (Kit de fragmentação do Ion Torrent). O DNA bacteriano foi incubado com enzima específica por 15 minutos a 37°C. Após esta etapa, foi feita a limpeza com 99 µL de AMPure BEADS® incubados 3 minutos a temperatura ambiente e posteriormente 5 minutos em estante magnética. Foi retirado o líquido restante e as *beads* ligadas a estante foram lavadas 2 vezes com 500 µL de etanol 70%. Após secagem, estas *beads* foram eluídas com 25 µL de tampão Low TE® e novamente colocado em estante magnética. O próximo passo foi a ligação dos adaptadores à amostra com os reagentes do Kit Library do Ion Torrent (10 µL do tampão da ligase, 2µL dos adaptadores, 2 µL de dNTP, 51 µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), 2 µL de DNA ligase e 2 µL de polimerase) e incubação de 15 minutos a 25 °C e 5 minutos a 72 °C. Foi, então, realizada uma nova limpeza por *beads* magnéticas e os fragmentos de aproximadamente 200 bp (pares de bases) foram selecionados por corrida em gel de agarose comercial (E-Gel® - Life Technologies, EUA). Uma reação de PCR em tempo real foi realizada para quantificar a amostra antes de seguir para a PCR emulsão.

3.13.2. PCR em emulsão

A PCR em emulsão foi realizada no aparelho One Touch® (Life Technologies, EUA) com a fase aquosa contendo 595 µL de água, 200 µL de *master mix* do kit do Ion Torrent, 100 µL de polimerase, 5 µL da amostra eluída e 100 µL de Ion Sphere™. Ao final da reação, o líquido foi recuperado e acrescido de 1 mL de One Touch Wash Solution.

Em seguida, foi iniciado o processo de enriquecimento no aparelho Enriched System com uma tira de 8 poços sendo que no primeiro havia 100 µL de amostra e o segundo 130 µL de uma solução de Dynabeads® MyOne™ Streptavidin a 10% (diluído em solução de lavagem). No terceiro, quarto e quinto poços havia 300 µL de solução de lavagem, o sétimo poço 300 µL de solução Melt Of (Tween 20 a 10%, NaOH 1M, água DEPC) e os poços 6 e 8 permaneceram vazios. Ao final do processo, foi recuperado a amostra em um microtubo de 200 µL que foi centrifugado a 15.500 xg e lavado duas vezes com solução de lavagem, restando um volume final de 100 µL. Foram adicionados 5 µL de Ion Sphere™ Quality Control e 150 µL de Annealing Buffer. O tubo foi centrifugado a 15.500 xg e o sobrenadante recuperado. O processo foi repetido e nos 15µL restantes foram adicionados 12 µL de Sequencing Primer. O tubo foi incubado 2 minutos a 95 °C e 2 minutos a 37 °C.

O chip do tipo 318 foi preparado com uma lavagem com 100 µL de isopropanol e duas lavagens com 100 µL de Annealing Buffer. Depois de adicionados 3 µL de Sequence Polimerase na amostra, foi realizada uma incubação de 5 minutos a temperatura ambiente e uma adição de mais 30 µL de Annealing Buffer a 50%. A solução foi sonicada em banho por 10 segundos e 30 µL adicionados no chip duas vezes. O chip foi centrifugado por 4 minutos e, então, colocado no aparelho Ion Torrent PGM™ para sequenciamento do genoma total do micro-organismo. Os dados foram obtidos e analisados em *software* específico (TMAP®, Life Technologies). A sequência genética obtida foi comparada com cepas *A. baumannii* do *Genebank*.

3.13.3. Montagem do sequenciamento genômico

A montagem do sequenciamento foi realizada pelo bioinformata da *London School of Hygiene and Tropical Medicine* (London, UK). As leituras brutas geradas foram extraídas do arquivo em formato sff gerado pelo Ion Torrent usando sff_extract

(http://bioinf.comav.upv.es/seq_crumbs/), com a opção de retirar as sequências referentes aos adaptadores de sequenciamento para gerar um arquivo em formato fastq com as leituras brutas. As leituras brutas sem adaptadores foram então analisadas com o pacote FASTQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) para avaliar a qualidade das sequencias. O pacote FASTX-toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) foi então usado para trimar as leituras a partir da base 100, efetuando a retirada das bases com qualidade Phred menor do que 18.

As leituras trimadas foram então usadas como entrada para montagens *de novo* em paralelo, usando os *softwares* Mira (CHEVREUX, 1999). Os *contigs* referentes a cada montagem foram mesclados em uma montagem *de novo* usando o *software* Geneious 7.1.5 (KEARSE, 2012), com parâmetros muito estringentes de montagem (maximum gaps per read = 5%; maximum gap size = 2; minimum overlap identity = 97%; minimum overlap = 100). Os *contigs* mesclados foram então visualmente curados para resolver ambiguidades pontuais. Os *contigs* foram ordenados usando o *software* online Projector2 (VAN HIJUM, 2005) para gerar um scaffold do genoma. Esse scaffold foi então submetido a anotação automática através da plataforma RAST - Rapid Annotation using Subsystems Technology (AZIZ, 2008), usando como modelo para gene o programa Glimmer (DELCHER, 1999).

3.13.4. Análise do sequenciamento genômico

A análise do sequenciamento genômico foi realizada por meio do *Align Sequences Nucleotide* BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) e *ResFinder 2.0 servers*, disponível gratuitamente no site http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/ através de alinhamento de sequencias genéticas depositadas no *GeneBank* (LARSEN, 2012).

Para utilização do BLAST foi necessário o arquivo com a sequência do genoma, em arquivo fasta, e a sequência dos genes de interesse, adquiridos pelo *GeneBank*, para alinhamento, o arquivo contendo a sequência do genoma foi encontrado por meio do botão "*Browser*", a sequência para alinhamento foi colocada no campo especifico, identificada como "*Query Sequence*" e então selecionado o botão "*Blast*".

O *ResFinder* é baseado em um banco de dados de mais de 2.000 genes de resistência que abrange 12 tipos de resistência a diferentes antimicrobianos, como aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, fosfomicina, ácido fusídico, glicopeptídeos,

macrolídeos, lincosamidas, estreptogramina-B, cloranfenicol, rifampicina, sulfonamidas, tetraciclina e trimetoprim. Por padronização do programa, apenas os genes com 98% de identidade aos genes da base de dados do ResFinder foram relatados nos isolados analisados.

Para executar a análise dos dados o arquivo com a sequência do genoma a ser analisada foi selecionado utilizando o botão "*Browse*", os tipos de agentes antimicrobianos para identificação de resistência foram selecionadas em "configuração antimicrobiana", o limiar para a percentagem de identidade entre genes no banco de dados e genes na sequência de entrada foi selecionada em "limite para % ID", o formato de entrada foi especificado em "tipo de suas leituras" (KLEINHEINZA, 2014), assim os genes que apresentaram uma cobertura e identidade >80% quando alinhadas ao gene de referência, foram considerados positivos.

Outra ferramenta utilizada para análise do sequenciamento foi o MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform), um programa de alinhamento de múltiplas sequências de alta velocidade, disponível gratuitamente em http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/, esta ferramenta é capaz, por meio do alinhamento com uma sequência de referência, de indicar as substituições de aminoácidos ocorridos por mutações genéticas.

Essa ferramenta foi utilizada para alinhamento dos genes do sistema regulatório PmrCAB dos isolados resistentes a colistina para detecção da substituição de aminoácidos. O primeiro passo é onde o usuário define a entrada das sequencias em formato fasta, nas etapas seguintes o usuário tem a possibilidade de alterar os parâmetros padrões e finalmente enviar ao servidor (KATOH, 2013).

3.14. Sequenciamento do genoma total bacteriano por MiSeq Illumina™

Posteriormente, para a determinação dos genes de resistência e genes com função de virulência de outros nove isolados do presente estudo foi realizado, usando a mesma metodologia de seleção anterior, foi realizado o sequenciamento pela metodologia de MiSeq Illumina™. A metodologia envolvida nesta análise genômica foi feita no Laboratório de Investigação Médica - 15 (LIM-15) da rede premium de multiusuários da USP, locado na Faculdade de Medicina da USP sob supervisão da Profa. Dra. Suely K. N. Marie.

O DNA total foi extraído com o kit Illustra Bacteria Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, USA). A qualidade do DNA foi verificada utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Delaware, USA) e a concentração do DNA foi verificada utilizando-se o fluorômetro Qubit® (Thermo Scientific, Delaware, USA). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1,5%.

Os isolados de *A. baumannii* selecionados foram submetidos ao sequenciamento total do genoma pela metodologia de MiSeq Illumina™. As bibliotecas foram preparadas com o kit comercial Nextera XT Illumina™ de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade das bibliotecas construídas foi avaliada em sistema *Tape Station* (Agilent) e posteriormente processados na plataforma de sequenciamento MiSeq Illumina™ (corrida com cartucho V3).

A qualidade dos arquivos gerados no sequenciamento foi avaliada pelos programas FastQC v. 0.11.3 e Trimmomatic v. 0.33. A montagem do genoma *de novo*, foi realizada com o programa Velvet Optimiser v. 2.2.5. Os *contigs* foram ordenados por Abacas v. 1.3.1 (ZHOU, 2011). A anotação do genoma foi realizada com o auxílio do programa Prokka v. 1.11. A análise do sequenciamento genômico foi realizada por meio do *Align Sequences Nucleotide* BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) e *ResFinder 2.0 servers*, disponível gratuitamente no site http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/ através de alinhamento de sequencias genéticas depositadas no *GeneBank* (LARSEN, 2012).

Posteriormente aos resultados gerados por essas ferramentas, a presença dos genes foi confirmada através de curadoria manual das CDSs e seus respectivos genes, através do programa Artemis 16.0.0.

3.15. Determinação do MLST

Multilocus Sequence Typing de bactéria (MLST) é um método de tipagem portátil que permite comparações interlaboratoriais e monitoramento em larga escala da lista crescente de epidemia nacional e internacional de clones envolvidos em surtos nosocomiais (MAIDEN, 2006).

A determinação dos Tipos de Sequencia (ST) foi realizada por meio do banco de dados PubMLST Oxford (http://pubmlst.org/abaumannii/) para os seis isolados sequenciados. Os alelos adquiridos por meio do sequenciamento genômico como, *cpn*60,

*gdh*B, *glt*A, *gpi*, *gyr*B, *rec*A e *rpo*D, foram submetidos ao banco de dados para determinação dos STs.

3.16. Avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo

Para avaliação da expressão do sistema regulatório PmrCAB, assim como expressão dos genes responsáveis pela biossíntese do LPS, foi realizado PCR quantitativo (PCRq), método baseado no monitoramento da fluorescência da amplificação de DNA ciclo a ciclo.

3.16.1. Preparo do sedimento bacteriano

O RNA utilizado na PCRq foi extraído de acordo com protocolos descritos por Adams e cols (2009). Os isolados foram cultivados em 5 mL de caldo BHI sob agitação por 16 horas a 37 ºC, em aerobiose. Para as amostras resistentes a colistina um segundo sedimento bacteriano foi preparado com os isolados cultivados em BHI acrescidos de colistina a 4 µg/mL. Foram preparados 2 mL de uma suspensão bacteriana na escala 0.5 de MacFarland (~1.8×10^8 UFC/mL), onde uma alíquota de 1 mL foi diluída (pelo menos 3 diluições seriadas de 1:100) e a última diluição foi semeada (100 µL) em ágar sangue de carneiro a 5%, para verificação de possível contaminação, e incubada a 37 ºC por 18 a 24 horas para contagem das colônias viáveis. A outra alíquota da suspensão bacteriana foi submetida ao tratamento com o reagente RNA Protect Bacteria (Qiagen, Valencia, CA) para posterior extração do RNA total.

3.16.2. Extração do RNA

A célula bacteriana foi rompida por tratamento enzimático conforme protocolo do RNA Protect Bacteria Handbook (Qiagen Valencia, CA; 2005), utilizando proteinase K e lisozima a 20 mg/mL.

A extração do RNA bacteriano foi realizada utilizando-se RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) e a digestão do DNA foi obtida através da adição de DNAse I (Qiagen, Valencia, CA), conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

3.16.3. Reação de amplificação quantitativa

A quantificação do RNA (ng/µL) foi obtida em equipamento NanodropC® (Uniscience) e a integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1.5% em tampão TBE 0.5 x, feito com água ultrapura tratada com DPEC (Invitrogen, USA).

A quantificação dos genes essenciais para biossíntese do LPS e genes do sistema regulatórios, *pmrA, pmrB* e *pmrC,* foi realizada por reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) one step (de uma etapa) em triplicata. O kit utilizado para este ensaio foi o Quantifast® SYBR®Green RT-PCR (Qiagen, CA, USA), o qual contém um corante fluorescente (SYBERGreen) intercalante de DNA que é captado pelo termociclador a cada novo ciclo da PCR, permitindo que o aparelho desenhe uma curva de amplificação para cada amostra.

O protocolo de amplificação constituiu-se de 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 15 minutos, e uma única fase de anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto. Os iniciadores foram os mesmos utilizados para PCR convencional. Os experimentos foram realizados em equipamento StepOne® Real Time (Applied Biosystems, USA) compostos com controle negativo e ATCC 19606. As reações de PCRq para estes genes foram realizadas de acordo com protocolo previamente descrito por Adams e cols (2009). Foi utilizado como referência o gene 16S RNAr, o qual é caracterizado por alta expressão e estabilidade.

3.16.4. Análise da amplificação

A análise da amplificação gênica foi realizada pela quantificação relativa, onde o número de cópias do gene de estudo é determinado baseando-se na curva padrão do número de cópias. O Ct (cycle threshold) é o primeiro ciclo da amplificação, no qual a cópia do DNA é detectada acima da linha basal, com isso, a presença de fatores interferentes, associados a estágios tardios da reação, são minimizados.

A partir dos valores de Ct da reação, foi calculado o valor do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, 2001):

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{(1+E)^{-\Delta Ct \text{ do gene alvo}}}{(1+E)^{-\Delta Ct \text{ do gene controle}}}$$

Onde:

E= eficiência da reação,

ΔCt do gene alvo = diferença entre o valor de Ct do gene alvo (amostra desconhecida) e do Ct do gene controle,

ΔCt do gene controle = diferença entre o valor de Ct do gene de referência e do gene alvo.

O valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é diretamente proporcional à expressão genética, ou seja, quanto maior o valor obtido de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ maior a quantidade de ácidos nucléicos na amostra, consequentemente maior a expressão do gene alvo.

Contudo, o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ somente poderá ser utilizado se as eficiências de amplificação de gene alvo e do gene controle apresentarem valores muito próximos, de modo a comprovar a eficiência da reação, uma vez que os genes alvo e controle foram amplificados, para a mesma amostra, em diluições seriadas. No entanto resulta em variações no valor de Ct, visto que quanto maior a diluição da amostra mais tardia a amplificação. A partir dos valores de Ct de cada uma das diluições, o termociclador desenha uma reta formada a partir dos valores de Ct e da concentração da amostra em cada uma das diluições. As reações que apresentaram inclinação da reta (slope) entre -3.1 e -3.9 foram consideradas dentro do padrão de eficiência aceitável.

Sendo assim, a quantificação relativa da expressão dos genes investigados para isolados de *A. baumannii* sensíveis a colistina foram comparados com a expressão dos genes de isolados resistentes a colistina.

Todas as amplificações foram realizadas com a curva de dissociação (melting), a qual foi realizada para verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

Foi realizado uma curva padrão construída para cada gene do sistema regulatório PmrCAB e para o gene referência 16S, com três diluições conhecidas, desta forma foi possível determinar a eficiência de cada ensaio.

Os ensaios foram realizados com amostras sensíveis a colistina e com amostras resistentes a colistina, que por sua vez foram cultivadas tanto na presença como na ausência do antimicrobiano, afim de avaliar possíveis diferenças na expressão gênica.

4. RESULTADOS

4.1. Isolados bacterianos

Todos os 20 isolados de *A. baumannii* obtidos do banco de cepas do LIM-54 eram provenientes de pacientes hospitalizados no HC-FMUSP. Os isolados foram coletados de diferentes materiais biológicos e os resultados prévios estão apresentados na Tabela 1.

4.2. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Os isolados de *A. baumannii* do presente estudo apresentaram alta proporção de resistência. O perfil de sensibilidade, determinado por microdiluição em caldo contra os 20 isolados, estão apresentados na Tabela 2, seguindo os critérios determinados pelo CLSI e EUCAST, de acordo com o Quadro 6. O antimicrobiano com maior sensibilidade foi a tigeciclina (95%).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo dos antimicrobianos incluídos na pesquisa para os 20 isolados de *Acinetobacter baumannii*. FMUSP, São Paulo.

ID	CIM (µg/mL)								
	COL	IMI	MER	GEN	AMI	TIG	RIF	*FOS	VAN
1	2	256	64	32	128	1	4	128	>128
2	2	32	128	32	128	0.5	4	128	>128
3	1	1	128	2	128	1	4	128	>128
4	2	32	128	64	128	0.5	4	128	>128
5	2	16	64	128	64	4	4	128	>128
6	1	128	128	32	128	1	4	128	>128
9	0.5	128	64	16	128	1	8	256	>128
11	0.5	64	16	2	128	0.5	4	128	>128
13	0.5	64	32	64	128	0.25	4	128	>128
14	0.5	64	64	64	128	0.5	4	128	>128
15	0.5	128	64	64	128	2	2	128	>128
18	1	16	16	2	256	0.5	4	128	>128
20	0.5	128	128	64	256	0.5	4	128	>128

continua

Tabela 2. Concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo dos antimicrobianos incluídos na pesquisa para os 20 isolados de *Acinetobacter baumannii*. FMUSP, São Paulo. (conclusão)

ID	CIM (µg/mL)								
	COL	IMI	MER	GEN	AMI	TIG	RIF	*FOS	VAN
22	16	32	32	4	256	2	4	64	>128
23	16	32	32	4	256	2	2	128	>128
24	32	32	32	4	512	2	2	64	>128
25	64	64	32	16	512	16	4	32	>128
26	32	32	32	4	128	2	2	64	>128
27	32	64	16	2	2	0.5	4	>256	>128
28	8	32	16	8	256	2	4	64	>128
RES (n°/%)	7 (35%)	19 (95%)	20 (100%)	11 (55%)	19 (95%)	1 (5%)	20 (100%)	19 (95%)	20 (100%)

ID: identificação dos isolados; COL: colistina, IMI: imipenem, TIG: tigeciclina, GEN: gentamicina, AMI: amicacina, MER: meropenem, RIF: rifampicina, *FOS: fosfomicina (ágar diluição); VAN: vancomicina.

A CIM da fosfomicina para os isolados do presente estudo foi determinada com base nos métodos de ágar diluição com ênfase no método de microdiluição em caldo, realizadas em triplicata, sendo a microdiluição o método de padronização para avaliação das combinações antimicrobianas. Os dois métodos apresentaram resultados coerentes, apenas um isolado de *A. baumannii* (isolado 25) apresentou sensibilidade a fosfomicina.

4.3. Identificação de genes de resistência de 20 isolados de *A. baumannii* por PCR

A técnica de PCR foi realizada para determinação de diferentes genes de resistência a carbapenêmicos, o gene $bla_{\text{OXA-51-like}}$, intrínseco a *A. baumannii,* foi detectado em todos os isolados (n=20), o gene $bla_{\text{OXA-143-like}}$ esteve presente em 7 isolados (35%), $bla_{\text{OXA-23-like}}$ em 10 isolados (50%) e o gene bla_{IMP} em apenas três isolado (15%). Os genes $bla_{\text{OXA-24}}$, $bla_{\text{OXA-58}}$ e os demais genes de metalo-β-lactamase (SPM, VIM, SIM, NDM) não foram detectados pela PCR. Genes que codificam proteínas de membrana externa como, *car*O (29 kDa) e *omp*33-36 kDa, foram detectados em todos os isolados, assim como genes responsáveis pela biossíntese do LPS (*lpx*A, *lpx*C, *lpx*D) e do sistema regulatório PmrCAB (*pmr*A, *pmr*B, *pmr*C).

4.4. Análise das proteínas de membrana externa

A avaliação de proteínas de membrana externa foi realizada para os sete isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina, sendo que, para os isolados sensíveis a colistina os resultados foram obtidos de estudo prévio (Anexo 2).

A Tabela 3 apresenta, em cruzes, a quantidade das três proteínas de membrana externa (kDa) relacionados, tanto ao CIM para os carbapenêmicos testados no estudo quanto para os genes de resistência aos β-lactâmicos detectados na PCR para os 20 isolados.

Tabela 3. Proteínas de membrana externa dos 20 isolados de *A. baumannii* relacionados ao CIM dos carbapenêmicos e aos genes de resistência aos carbapenêmicos detectados pela PCR no estudo. FMUSP, São Paulo.

ID	Proteínas de Membrana Externa (kDa)			Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		β-lactamase (PCR)
	29	33-36	43	Imipenem	Meropenem	
1	+++	+++	+++	256	64	OXA-51
2	+	+++	+++	32	128	OXA-51
3	+++	+++	+++	1	128	OXA-51
4	+	+++	+	32	128	OXA-51, 143
5	+++	++++	+++	16	64	OXA-51
6	+	++	A	128	128	OXA-51, 143; IMP
9	+++	+++	+++	128	64	OXA-51; IMP
11	+	+++	A	64	16	OXA-51, 143, 23
13	A	+++	A	64	32	OXA-51, 143
14	+	++++	+	64	64	OXA-51, 143; IMP
15	+	+	+	128	64	OXA-51
18	+++	+++	+++	16	16	OXA-51, 143, 23
20	+	+++	A	128	128	OXA-51, 143, 23
22	++	+++	+++	32	32	OXA-51, 23
23	++	+++	+++	32	32	OXA-51, 23
24	++	+++	+++	32	32	OXA-51, 23
25	++	+++	+++	64	32	OXA-51, 23
26	++	+++	+++	32	32	OXA-51, 23
27	++	+++	+++	64	16	OXA-51, 23
28	++	+++	+++	32	16	OXA-51, 23

ID: identificação dos isolados; (+++): intensidade da banda igual a cepa padrão, (++): intensidade da banda uma vez menor à cepa padrão, (+): intensidade da banda duas vezes menor à cepa padrão, (++++): intensidade da banda maior à cepa padrão, A: ausência da proteína.

4.5. Perfil molecular dos isolados por PFGE

De acordo com o *software* BioNumerics versão 7.1 (Applied Maths), foram gerados três clusters para os isolados resistentes a colistina e oito clusters para os isolados sensíveis a colistina (Anexo 1).

A Figura 4 apresenta o dendrograma de avaliação da variabilidade genética dos 20 isolados de *A. baumannii*, com os respectivos perfis clonais dos isolados resistentes e sensíveis a colistina.

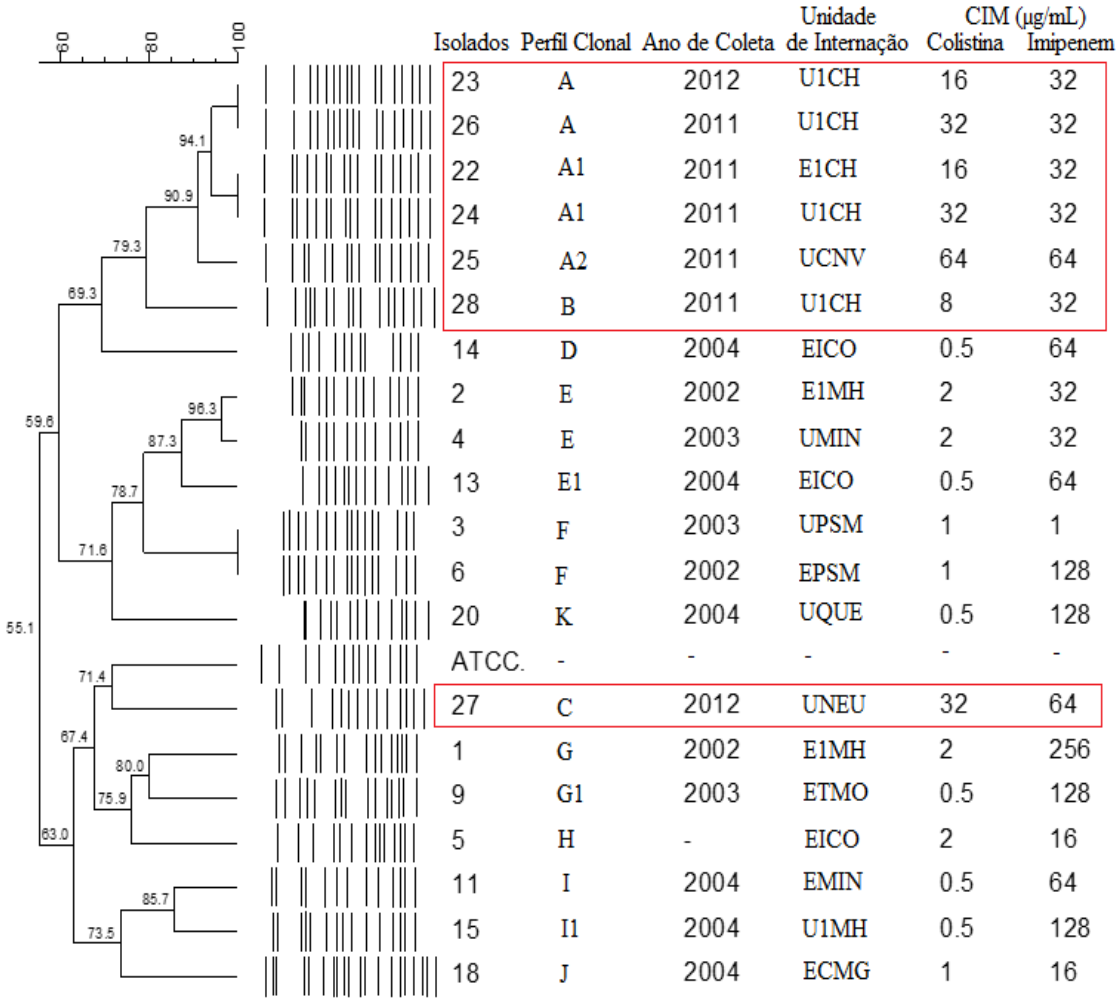


Figura 4. Dendrograma de avaliação da variabilidade genética para os 20 isolados de *A. baumannii* de acordo com identificação dos isolados e seus respectivos perfis clonais, ano de coleta, unidade de internação e CIM de colistina e imipenem. FMUSP, São Paulo.

4.6. Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas pelo método de *checkerboard*

A avaliação do efeito sinérgicos dos 20 isolados de *A. baumannii*, realizado pelo método de *checkerboard*, foi determinado pelos métodos de interpretação *two-well* e CIF.

Das 25 combinações realizadas entre os diferentes antimicrobianos, o maior número de efeitos sinérgicos encontrado, pelo método de *two-well*, foram entre fosfomicina-amicacina (90%) seguidos de colistina-vancomicina (80%), colistina-rifampicina (65%) e fosfomicina-gentamicina (65%). Pelo método de CIF foram encontrados resultados sinérgicos somente para os isolados resistente a colistina, sendo para um isolado na combinação de colistina-vancomicina (5%) e para sete isolados na combinação de colistina-rifampicina (35%).

Os resultados das 25 combinações realizadas por *checkerboard* com interpretação pelo método de *two-well* estão representadas na Figura 5. Efeito antagônico não foi observado em nenhuma combinação para ambos métodos de interpretação.

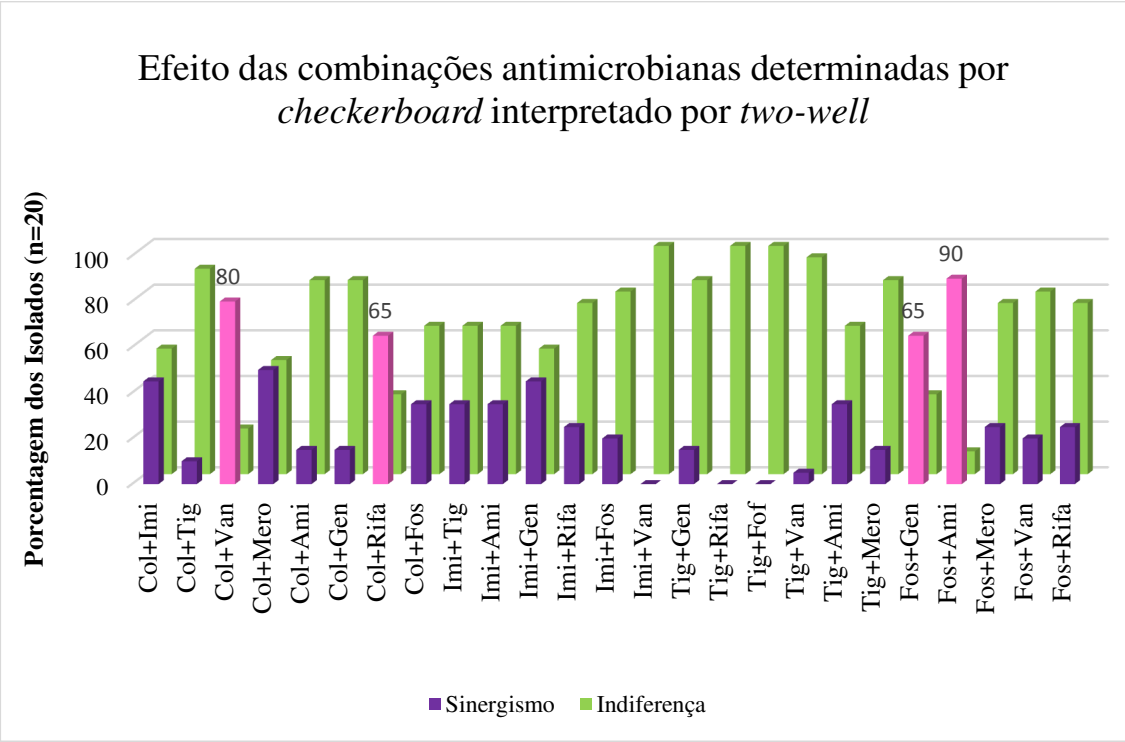


Figura 5. Efeito das combinações antimicrobianas, realizados pelo método de *checkerboard* e interpretado pelo método de *two-well* para os 20 isolados de *A. baumannii*. FMUSP, São Paulo.

As combinações entre imipenem-vancomicina, tigeciclina-rifampicina e tigeciclina-fosfomicina não apresentaram efeitos sinérgicos em ambos métodos de interpretação.

Entre os isolados sensíveis a colistina (n=13) a prevalência do efeito sinérgico, pelo método de *two-well*, continuou entre as combinações de colistina-vancomicina (69%), fosfomicina-gentamicina (77%) e fosfomicina-amicacina (100%).

Pelo método de interpretação de CIF não foram encontrados resultados sinérgicos para os isolados sensíveis a colistina e efeito antagônico não foi observado.

Para os isolados sensíveis a colistina, as combinações antimicrobianas de colistina-imipenem, imipenem-vancomicina, tigeciclina-rifampicina e tigeciclina-fosfomicina não apresentaram nenhum resultado sinérgico pelo método de *checkerboard*.

Para os isolados resistentes a colistina (n=7) o efeito sinérgico, pelo método de CIF, foi observado somente para as combinações entre colistina-vancomicina (14%) e colistina-rifampicina (100%). Para os mesmos isolados, pelo método de *two-well*, o efeito sinérgico foi observado em 16 combinações e estão representados na Figura 6.

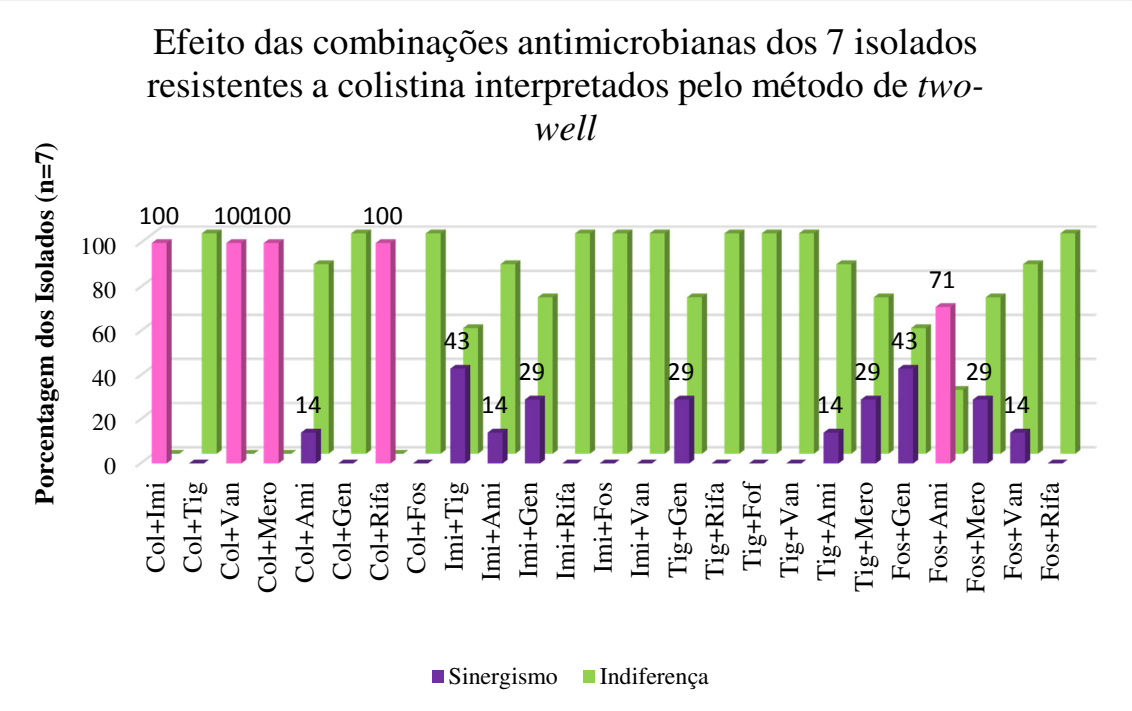


Figura 6. Efeito das combinações antimicrobianas, pelo método de *checkerboard* interpretado por *two-well*, para os 7 isolados resistentes a colistina. FMUSP, São Paulo.

4.7. Determinação dos efeitos das combinações antimicrobianas pelo método de *time-kill*

O teste de *time-kill* foi realizado para todos os isolados (n=20) de *A. baumannii* com as mesmas combinações antimicrobianas utilizadas para o *checkerboard,* afim de determinar o efeito das combinações antimicrobianas num período de 24 horas. O efeito sinérgico foi observado, pelo *time-kill*, com uma concentração mais baixa (0.5 x e 1.0 x os valores de CIM) que utilizado no tratamento clínico (2.0 a 8.0 x os valores CIM).

O efeito sinérgico pelo *time-kill* foi observado em 84% das 25 combinações antimicrobianas testadas. As combinações de tigeciclina com gentamicina, rifampicina, fosfomicina e vancomicina não apresentaram efeito sinérgico ente os isolados. Todos os isolados com efeito sinérgico apresentaram diminuição de pelo menos 2 $\log_{10}$ no segundo tempo (2 h) do ensaio. Efeito antagônico não foi observado para nenhuma combinação.

Nas combinações antimicrobianas testadas em concentrações mais altas (4 x CIM e 2 x CIM), todos os isolados apresentaram resultados sinérgicos, exceto os isolados 2 e 23 na combinação de tigeciclina-gentamicina e o isolado 18 na combinação de colistina-gentamicina. Para as combinações nas concentrações de 0.25 x CIM e 0.125 x CIM, o efeito sinérgico só foi observado nas combinações entre colistina-vancomicina para todos os isolados.

A Tabela 4 apresenta os resultados dos efeitos determinados pelos métodos de c*heckerboard* (CIF e *two-well*) e *time-kill* para comparação entre os dois métodos utilizados, sendo representado apenas as combinações onde foram encontrados maiores efeitos sinérgicos, observando que o método de *time-kill* apresenta maior efeito sinérgico comparado ao *checkerboard.*

Para melhor compreensão do efeito das combinações antimicrobianas foram construídas curva de morte de todos os isolados. A Figura 7 mostra a curva de morte de quatro isolados que representam diferentes efeitos das combinações.

Tabela 4. Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de *checkerboard* e *time-kill* nas combinações com maior número de efeito sinérgico. FMUSP, São Paulo.

ID	Combinações antimicrobianas com maior efeito sinérgicos																	
	Col+Imi			Col+Van			Col+Mer			Col+Rif			Fos+Gen			Fos+Ami		
	[a]CIF	2well	[b]TK	[a]CIF	2well	[b]TK	[a]CIF	2well	[b]TK	[a]CIF	2well	[b]TK	[a]CIF	2well	[b]TK	[a]CIF	2well	[b]TK
1	1.5/I	I	2/2h	0.7/I	**S**	3/2h	1.2/I	**S**	2/2h	0.3/S	**S**	6/2h	1.0/I	**S**	3/2h	1.5/I	**S**	2/2h
2	2.0/I	I	2/2h	1.0/I	**S**	4/2h	2.0/I	I	2/2h	0.5/S	**S**	3/2h	2.0/I	**S**	3/2h	1.2/I	**S**	2/2h
3	3.0/I	I	6/4h	1.5/I	I	3/2h	1.0/I	I	2/2h	0.5/S	**S**	6/2h	2.0/I	**S**	6/2h	1.2/I	**S**	2/2h
4	1.5/I	I	2/2h	0.7/I	I	3/2h	2.0/I	**S**	2/2h	1.5/I	**S**	3/2h	2.0/I	**S**	4/2h	1.2/I	**S**	2/2h
5	2.0/I	I	6/2h	0.7/I	**S**	3/2h	2.0/I	I	2/2h	1.0/I	**S**	2/2h	1.5/I	I	3/2h	1.5/I	**S**	3/2h
6	1.5/I	I	2/2h	1.5/I	**S**	4/2h	1.2/I	**S**	2/2h	1.0/I	**S**	4/2h	1.5/I	**S**	4/2h	1.2/I	**S**	2/2h
9	1.5/I	**S**	2/2h	1.5/I	**S**	4/2h	2.0/I	I	2/2h	1.0/I	I	2/2h	0.6/I	**S**	4/2h	1.2/I	**S**	2/2h
11	2.0/I	I	2/2h	1.0/I	**S**	4/2h	2.0/I	I	2/2h	0.7/I	I	2/2h	2.0/I	I	3/2h	1.2/I	**S**	2/2h
13	1.5/I	I	6/2h	2.0/I	I	4/2h	2.0/I	I	2/2h	1.0/I	I	2/2h	1.5/I	**S**	4/2h	1.5/I	**S**	2/2h
14	2.0/I	I	2/2h	1.5/I	I	3/2h	2.0/I	I	2/2h	1.0/I	I	2/2h	1.2/I	**S**	4/2h	2.0/I	**S**	2/2h
15	2.0/I	I	2/2h	1.5/I	**S**	4/2h	2.0/I	I	2/2h	1.5/I	I	2/2h	1.5/I	**S**	2/2h	1.5/I	**S**	2/2h
18	1.5/I	**S**	2/2h	2.0/I	**S**	4/2h	2.0/I	I	2/2h	1.2/I	I	2/2h	2.0/I	I	4/2h	1.5/I	**S**	2/2h
20	2.0/I	I	2/2h	0.7/I	**S**	4/2h	2.0/I	I	2/2h	1.5/I	I	2/2h	1.5/I	**S**	3/2h	1.0/I	**S**	2/2h
22	0.7/I	**S**	3/2h	0.6/I	**S**	4/2h	1.2/I	**S**	6/2h	**0.1/S**	**S**	6/2h	2.0/I	I	4/2h	1.2/I	**S**	2/2h
23	0.6/I	**S**	2/2h	0.6/I	**S**	4/2h	1.1/I	**S**	2/2h	**0.1/S**	**S**	5/2h	2.0/I	I	4/4h	1.5/I	**S**	2/2h
24	1.5/I	**S**	3/2h	0.6/I	**S**	6/2h	1.2/I	**S**	2/2h	**0.1/S**	**S**	6/2h	2.0/I	I	4/4h	1.5/I	**S**	2/2h
25	2.2/I	**S**	2/2h	1.1/I	**S**	6/2h	1.0/I	**S**	6/2h	**0.1/S**	**S**	3/2h	0.7/I	**S**	3/2h	1.5/I	**S**	2/2h
26	0.7/I	**S**	2/2h	1.0/I	**S**	5/2h	1.0/I	**S**	5/2h	**0.1/S**	**S**	6/2h	2.0/I	I	4/2h	1.5/I	**S**	2/2h
27	1.2/I	**S**	4/2h	1.2/I	**S**	4/2h	1.0/I	**S**	6/2h	**0.1/S**	**S**	6/2h	1.5/I	**S**	4/2h	2.0/I	I	2/2h
28	0.7/I	**S**	2/2h	**0.1/S**	**S**	4/2h	1.0/I	**S**	2/2h	**0.1/S**	**S**	3/4h	1.0/I	**S**	3/2h	2.0/I	I	2/2h
S(%)	0	45	100	5	80	100	0	50	100	50	65	100	0	65	100	0	90	100

ID: identificação dos isolados; Col: colistina; Imi: imipenem; Mer: meropenem; Gen: gentamicina; Ami: amicacina; Rif: rifampicina; Fos: fosfomicina; I: indiferente; S: sinergismo; h: horas. [a]CIF (Concentração Inibitória Fracionada): CIF/efeito; [b]TK (time-kill): diminuição log/período da contagem.

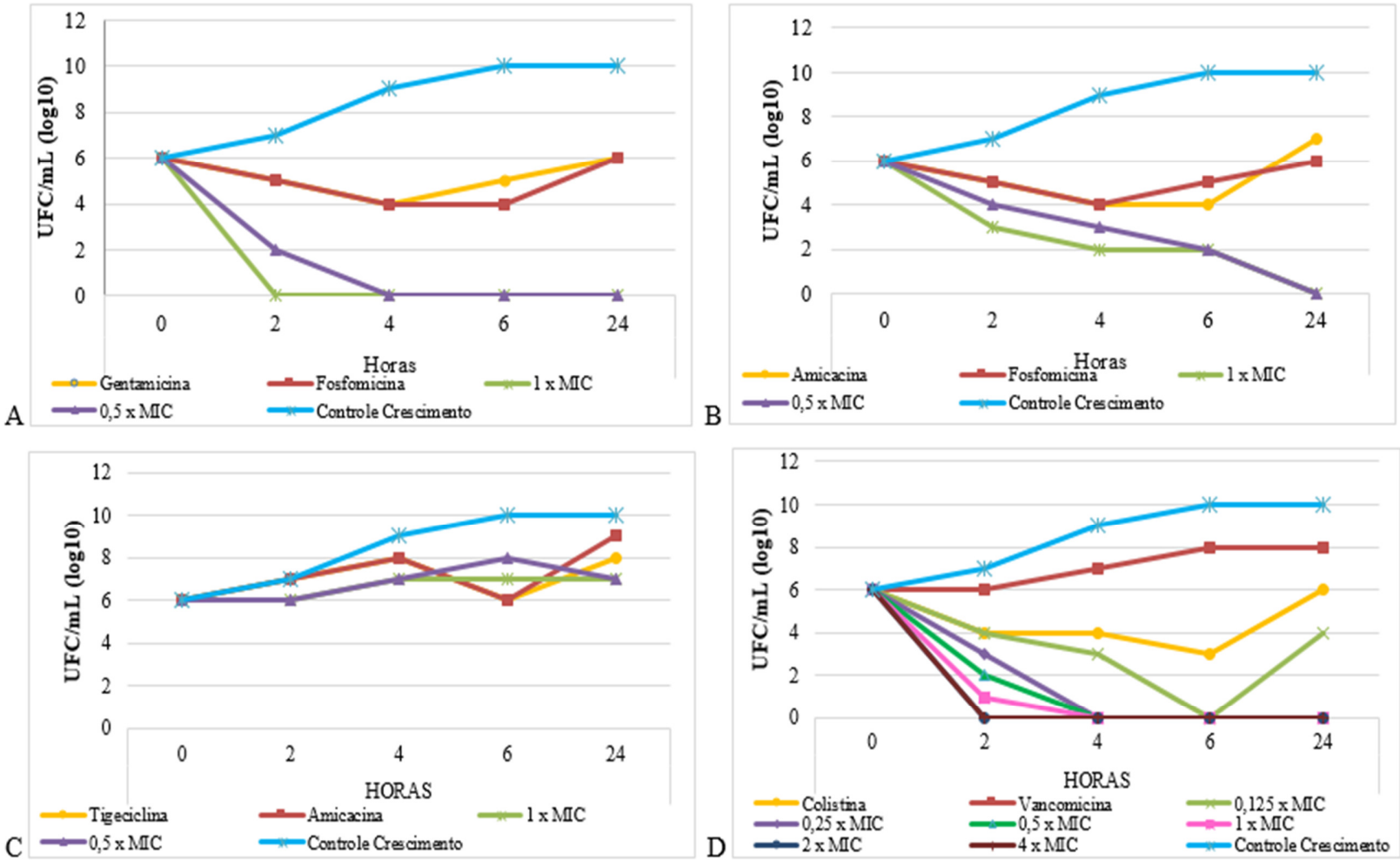


Figura 7. Cinética de crescimento em função do tempo de diferentes combinações antimicrobianas. A- Fosfomicina com gentamicina (isolado 3), B- fosfomicina com amicacina (isolado 9), C- tigeciclina com amicacina (isolado 25) e D- colistina com vancomicina (isolado 26). FMUSP, São Paulo.

4.8. Análise do sequenciamento genômico

A análise do sequenciamento genômico, realizada pelo *Align Sequences Nucleotide* BLAST e *ResFinder 2.0 servers*, mostrou a presença de genes de resistência a carbapenêmicos, não realizados pelo método de PCR, genes com função de virulência, genes envolvidos com a resistência aos aminoglicosídeos, rifampicina e fosfomicina. Os genes determinados pelo sequenciamento relacionados a resistência aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fosfomicina estão apresentados na Tabela 5.

Para os genes de virulência comparados a ATCC 19606, o gene *ompA,* relacionados a aderência, foi determinado para todos os isolados. Os genes envolvidos na formação de biofilme (*adeFGH, bap, csuA/BABCDE, pgaABCD*), estiveram presentes em todos os isolados, apenas o isolado 18 não apresentou o gene *bap.* Os genes codificadores das enzimas fosfolipase C e D (*plc, plcd*), assim como os genes codificadores de proteínas responsáveis pela evasão do sistema imune (*lpxACDLM, lpsB*), captação do ferro (*bauDCEBA basCD*) e estabilidade celular (*pbpG*) foram identificados em todos os isolados. Genes relacionados ao *quorum-sensing* (*abaI*), estiveram ausentes nos isolados resistentes a colistina.

Quanto aos reguladores dos genes de virulência, GacSA e BfmRS, foram observadas substituições de aminoácidos nos genes *gacS* somente dos isolados resistentes a colistina em E510D, e substituições no gene *bfmS* em N453S de ambos isolados, resistentes e sensíveis a colistina. Os genes *gacA* e *bfmR* não apresentaram substituições de aminoácidos.

Como análise complementar da virulência, foi analisado os SNPs de dois isolados resistentes a colistina (23 e 25) em comparação com o isolado 28 todos pertencentes ao ST233; os isolados apresentaram mutações em alguns genes relacionados a formação do biofilme, aderência e captação de ferro. As mutações encontradas estão apresentadas na Tabela 6.

Os genes envolvidos na síntese do LPS como, *lpx*A, *lpx*C e *lpx*D foram encontrados em todos os isolados assim como os genes do sistema regulatório PmrCAB.

A sequência de inserção IS*Aba1* foi encontrada a montante dos genes bla_{OXA-51} e bla_{OXA-23}, a sequência de inserção IS*Aba11* foi encontrada somente em um isolado sensível a colistina.

Com relação a bomba de efluxo foram determinados genes das três bombas (AdeABC, AdeFGH, AdeIJK) e seus reguladores, pertencentes a família RND, relacionadas com a resistência de diferentes antimicrobianos.

Entre os genes *rpoB* e *gyrA*, relacionados com a resistência a rifampicina, foram determinados para todos isolados sem substituição de aminoácidos quando comparados com a cepa referencia ATCC 19606, pelo MAFFT.

Quanto a resistência a fosfomicina, não foi encontrado nenhum gene relacionado ao sistema de transporte UhpT, já ao sistema GlpT os genes não apresentaram alterações de aminoácidos. Contudo, foi determinado o gene *ptsP,* sinônimo ao gene *ptsI* de *E. coli* com grande número de substituições de aminoácido comparado a cepa referência ATCC 19606, também foi determinado o gene *cyaA* com mutações, ambos envolvidos com alteração do nível de cAMP. Genes codificadores de glutatione-S-transferase (*fosA*) foram encontrados em todos os isolados e o gene codificador de epoxide hydrolase (*fosX*) foi encontrado somente entre os isolados sensíveis a colistina.

Tabela 5. Genes de mecanismos de resistência determinados pelo sequenciamento genômico total pela metodologia Ion Torrent e Illumina para quinze isolados de *A. baumannii.* FMUSP, São Paulo.

ID	Cluster	ST (Oxford)	CC	Genes de resistência a carbapenêmicos	Genes de resistência a aminoglicosídeos	Genes de resistência a fosfomicina
1	G	472	283	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{IMP-like}}$	*aacA4, aac(6')-31, aadA1*	*fosA*
3	F	236	103	$bla_{\text{OXA-51-like}}$	*aph(3´)-Vla, aadA1*	*fosA, fosX*
4	E	339	St	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-143-like}}$	*aadB, strA, strB*	*fosA*
6	F	236	103	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{IMP-like}}$	*aadA1, aph(3´)-Vla*	*fosA, fosX*
11	I	407	St	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$	*aph(3´)-Vla*	*fosA, fosX*
13	E1	339	St	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-143-like}}$	*aph(3')-Vla, aadB*	*fosA*
18	J	407	St	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$	*aph(3´)-Vla*	*fosA, fosX*
20	K	339	St	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-143-like}}$	*aph(3')-VIa, aadB, strA, strB*	*fosA*
22	A1	233	113	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{TEM-1}}$	*aph(3')-VIa, aadA1, strA, strB*	*fosA*
23	A	233	113	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{TEM-1}}$	*aph(3´)-Vla, aadA1, strA, strB*	*fosA*
24	A1	233	113	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{TEM-1}}$	*aph(3´)-Vla, aadA1, strA, strB*	*fosA*
25	A2	233	113	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-88-like}}$, $bla_{\text{TEM-1}}$	*aph(3´)-Vla, aadA1, strA, strB*	*fosA*
26	A	233	113	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{TEM-1}}$	*aph(3´)-Vla, aadA1, strA, strB*	*fosA*
27	C	407	St	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$	NI	*fosA*
28	B	233	113	$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{TEM-1}}$	*aadA1, strA, strB*	*fosA*

ID: identificação dos isolados; ST: Sequence typing; CC: complexo clonal; St: singletons; NI: Não identificado

Tabela 6. Genes de virulência com mutações dos isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina 23 e 25 comparados ao isolado 28. FMUSP, São Paulo.

Genes	**Fator de virulência**	**Produtos**	**Mudanças de Nucleotídeos**				**Mudanças de Aminoácidos**
			Isolado 23		**Isolado 25**		
			Tipo de Variante	Variante	Tipo de Variante	Variante	
bap	Biofilme, Aderência	Hemolysin-type calcium-binding domain-containing protein	NS	A-T	NS	A-C	V122A
					NS	G-A	
csuD	Biofilme	Protein CsuD	Ausente	Ausente	NS	T-C	Q76K
pgaA	Biofilme	Protein YcdS precursor	Ausente	Ausente	SI	A-G	Ausente
					SI	T-A	
pgaB	Biofilme	Hemin storage signal peptide protein - xylanase/chitin deacetylase	Ausente	Ausente	SI	A-G	Ausente
pgaC	Biofilme	Hemin storage system HmsR protein - glycosyltransferase	Ausente	Ausente	NS	A-C	R399T, A400C, R401S, W402L, V403G, S404K
bauB	Acinetobactin	ABC-type enterochelin transport system, periplasmic component	Ausente	Ausente	DL	CG-C	A305Q, S307Q, Q321K
basD	Acinetobactin	High-molecular-weight protein 2	Ausente	Ausente	IN	G-GT	Ausente
tonB	Acinetobactin	TonB-dependent receptor protein	NS	T-A	Ausente	Ausente	P30T, T51N, A94T
			NS	G-T			
			NS	G-T			

NS: Não-Sinônimo; SI: Sinônimo; DL: Deleção; IN: Inserção. Abreviações dos aminoácidos: V-Valina, A-Alanina, Q-Glutamina, K-Lisina, R-Arginina, T-Treonina, C-Cisteína, S-Serina, W-Triptofano, L-Leucina, G-Glicina, P-Prolina, N-Asparagina.

4.9. Identificação de mutação genética no sistema regulatório PmrCAB e genes da biossíntese do LPS

Quando comparados entre si, os isolados sensíveis a colistina, 03 e 06 mostraram a mesma sequência de aminoácidos para PmrA, PmrB, PmrC e pertenciam ao mesmo ST103, no entanto, o isolado 18 mostrou uma sequência diferente em comparação com outras sensíveis e pertencia ao ST407. Enquanto os isolados resistentes a colistina, pertencentes ao ST233 mostraram a mesma sequência de aminoácidos para PmrA, PmrB, PmrC entre eles, porém diferente das sensíveis.

Quando comparado com a ATCC 19606 o PmrA do isolado 18 foi idêntico a cepa referência, porém os demais isolados sensíveis apresentaram quatro de substituição, I18T; T44N; E133Q; T67S, enquanto para PmrB e PmrC a substituição de aminoácidos não foi observada.

Substituições de aminoácido foram observados em todos os isolados resistentes a colistina e estão apresentados na Tabela 7.

Para LpxA não foi observada substituição de aminoácidos para ambos os isolados sensíveis e resistentes, para LpxC a substituição ocorreu em N287D para todos os isolados e para LpxD os isolados sensíveis apresentaram substituições em Y75D e K117E, e os isolados resistentes em V3A, Y75D e K117E.

Tabela 7. Substituição de aminoácidos e expressão dos genes *pmrC, pmrA* e *pmrB* dos isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina. FMUSP, São Paulo.

Genes	Isolados	Aminoácidos substituídos	Expressão ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
pmrA	22	D82G, **S119T**	**0.94**
	23	D82G, **S119T**	**0.95**
	24	Indeterminado	**0.88**
	25	M12K	**0.80**
	26	D82G, **S119T**	**0.95**
	27	Sem substituição	0.01
	28	**S119T**	**0.86**
pmrB	22	M1V, S14L, G21V, **V227A,** N440H	**0.61**
	23	G21V, **V227A**, N440H	**1.00**
	24	Indeterminado	**0.59**
	25	**V227A**	0.16
	26	**V227A,** N440H	0,71
	27	R181C, **V227A,** R320G, N440H	**0,67**
	28	P127L, **V227A**, N397H	0.41
pmrC	22	**N116D,** V227I, N284D	**0.88**
	23	R46Q, **N116D**	**0.93**
	24	Indeterminado	**0.69**
	25	L26F, **N116D**, I343V, P345N, Q346K, H351S, S352Q	0.41
	26	**N116D**	**0.90**
	27	**N116D,** R125H, N300D, A370S e V486I	0.16
	28	**N116D**	**0.73**

Super expressão foi considerada acima de 0.5 de acordo com $2^{-\Delta\Delta Ct}$; Abreviações dos aminoácidos: A-Alanina, D-Aspartato, F-Fenilalanina, G-Glicina, H-Histidina, I-Isoleucina, K-Lisina, L-Leucina, M- Metionina, N-Asparagina, P-Prolina, Q-Glutamina, R-Arginina, S-Serina, T-Treonina, V-Valina.

4.10. MLST determinados nos isolados sequenciados

Por meio da análise do banco de dados PubMLST foi determinando cinco tipos diferentes de ST. Para os isolados sensíveis a colistina foi determinado o ST236 pertencentes ao CC103, ST472 ao CC283, ST339 singleton, para os isolados resistentes a colistina foi determinado o ST233, pertencente ao CC113 e o ST407 singleton foi determinado tanto para isolados resistentes como sensível a colistina. A Tabela 8 apresenta os ST e CC respectivamente relacionados com os perfis moleculares de cada isolado.

Tabela 8. Perfil molecular dos isolados submetidos ao sequenciamento do genoma total (n=15) e seus respectivos ST e CC. FMUSP, São Paulo.

Isolados	Perfil de resistência a colistina	Perfil Clonal	Sequence Type	Complexo Clonal
01	S	G	472	283
03	S	F	236	103
04	S	E	339	Singleton
06	S	F	236	103
11	S	I	407	Singleton
13	S	E1	339	Singleton
18	S	J	407	Singleton
20	S	K	339	Singleton
22	R	A1	233	113
23	R	A	233	113
24	R	A1	233	113
25	R	A2	233	113
26	R	A	233	113
27	R	C	407	Singleton
28	R	B	233	113

S: sensível; R: resistente

4.11. Expressão gênica do sistema regulatório PmrCAB e dos genes da biossíntese do LPS por meio da PCR quantitativa

A reação de PCRq foi realizada utilizando SYBR Green I. Devido à baixa especificidade deste corante alguns critérios, como análise do pico da curva de dissociação foram rigidamente analisados na validação do ensaio. Assim, foram consideradas viáveis somente as amostras com pico único e dentro do eixo esperado da curva de dissociação (Anexo 3).

A investigação do operon PmrCAB de expressão relativa foi comparada com a cepa sensível a colistina (ATCC 19606), a superexpressão foi considerado acima de 0.5 de acordo com $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A expressão foi independente da presença ou ausência de colistina. Entre os isolados resistentes a colistina, a superexpressão foi observado para todos os genes do operon PmrCAB, exceto para o isolado 25 que superexpressou apenas o gene *pmrA* e o isolado 28 os genes *pmrA* e *pmrC* e o isolado 27 que super expressou somente *pmrB.* Os isolados sensíveis a colistina apresentaram expressão do PmrCAB <0.50.

A Tabela 7 apresenta a relação entre as substituições de aminoácidos dos isolados resistentes a colistina e o nível de expressão.

Para os genes da biossíntese de LPS, a super expressão estava presente apenas em um isolado sensível a colistina e um isolado resistente a colistina, entre os isolados sensíveis, o isolado 03 super expressou o gene *lpxA* e para isolados resistentes, o 23 super expressou o *lpxA* e *lpxC*. A super expressão do gene *lpxD* não foi observada.

4.12. Avaliação dos efeitos das combinações antimicrobianas e dos mecanismos de resistência

A avaliação dos resultados das combinações em comparação aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos isolados de *A. baumannii* demonstrou que entre os isolados resistentes a colistina o sinergismo é predominante nas combinações que envolvem colistina. Com relação aos carbapenêmicos a variabilidade de efeitos das combinações foi maior comparada aos demais antimicrobianos testados, porém os isolados que apresentam MBL parecem apresentar maior efeito sinérgico para as combinações antimicrobianas envolvendo imipenem e para os isolados que apresentam diferentes OXA, o efeito sinérgico é menor.

Para as combinações com aminoglicosídeos o efeito sinérgico foi mais frequente entre os isolados que apresentaram menores números de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Essa relação entre efeito sinérgico e mecanismos de resistência não foi verificada para as combinações envolvendo tigeciclina. Já para as combinações envolvendo fosfomicina, o efeito sinérgico pode sofrer influencia dos mecanismos de resistência as drogas combinadas a ela. As combinações com fosfomicina e aminoglicosídeos foram as que apresentaram melhor resultados, os efeitos indiferentes observador entre fosfomicina-gentamicina estão entre isolados sensíveis a gentamicina, porém que apresentam maior número de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos.

A Tabela 9 apresenta os mecanismos de resistência de cada isolado e a porcentagem dos efeitos sinérgicos de cada grupo de drogas combinados.

Tabela 9. Avaliação dos mecanismos de resistência dos 20 isolado de *A. baumannii* com relação aos resultados sinérgicos apresentados para cada grupo de drogas testados. FMUSP, São Paulo.

ID	PFGE	CIM (µg/mL)								OMP			Mecanismos de Resistência (PCR e sequenciamento)			Sinergismo por grupos de ATB (%)				
		COL	IMI	MER	AMI	GEN	TIG	RIF	FOS	29 kDa	33-36 kDa	43 kDa	Carbapenêmicos	Aminoglicosídeos	Fosfomicina	Col (n=8)	Imi (n=6)	Tig (n=6)	Fos (n=5)	Ami (n=8)
1	G	2	256	64	128	32	1	4	128	+++	+++	+++	OXA-51, IMP-1	*aacA4, aac(6')-31, aadA1*	*ptsP*,cyaA*, fosA,*	63	67	0	100	63
2	E	2	32	128	128	32	0.5	4	128	+	+++	+++	OXA-51	NI	NI	50	0	0	80	38
3	F	1	1	128	128	2	1	4	128	+++	+++	+++	OXA-51	*aph(3')-VIa*	*ptsP*,cyaA*, fosA, fosX*	13	17	17	80	38
4	E	2	32	128	128	64	0.5	4	128	+	+++	+	OXA-51, OXA-143	*aadB, strA, strB*	*ptsP*,cyaA*, fosA,*	50	0	17	60	38
5	H	2	16	64	64	128	4	4	128	+++	++++	+++	OXA-51	NI	NI	25	17	0	20	13
6	F	1	128	128	128	32	1	4	128	+	++	A	OXA-51, IMP-1	*aadA1, aph(3´)-Vla*	*ptsP*,cyaA*, fosA, fosX*	38	50	17	40	50
9	G1	0.5	128	64	128	16	1	8	256	+++	+++	+++	OXA-51, IMP-1	NI	NI	50	83	0	60	63
11	I	0.5	64	16	128	2	0.5	4	128	+	+++	A	OXA-51, OXA-23	*aph(3')-VIa*	*ptsP*,cyaA*, fosA, fosX*	38	17	17	40	50
13	E1	0.5	64	32	128	64	0.25	4	128	A	+++	A	OXA-51, OXA-143	*aph(3')-Via, aadB*	*ptsP*,cyaA*, fosA,*	13	0	17	40	38
14	D	0.5	64	64	128	64	0.5	4	128	+	++++	+	OXA-51, OXA-143, IMP-1	NI	NI	13	83	33	60	63
15	I1	0.5	128	64	128	64	2	2	128	+	+	+	OXA-51	NI	NI	13	17	0	40	38
18	J	1	16	16	256	2	0.5	4	128	+++	+++	+++	OXA-51, OXA-23	*aph(3´)-Vla*	*ptsP*,cyaA*, fosA, fosX*	38	33	17	20	50
20	K	0.5	128	128	256	64	0.5	4	128	+	+++	A	OXA-51, OXA143	*aph(3')-VIa, aadB, strAB*	*ptsP*,cyaA*, fosA,*	25	33	17	40	63
22	A1	16	32	32	256	4	2	4	64	++	+++	+++	OXA-51, OXA-23, TEM	*aph(3')-VIa, aadA1, strAB*	*ptsP*,cyaA*, fosA,*	50	17	0	20	13
23	A	16	32	32	256	4	2	2	128	++	+++	+++	OXA-51, OXA-23, TEM	*aph(3')-VIa, aadA1, strAB*	*ptsP*,cyaA*, fosA,*	50	17	0	20	13
24	A1	32	32	32	512	4	2	2	64	++	+++	+++	OXA-51, OXA-23, TEM	*aph(3')-VIa, aadA1, strAB*	*ptsP*,cyaA*, fosA,*	50	17	17	20	25
25	A2	64	64	32	512	16	16	4	32	++	+++	+++	OXA-51, OXA-23, OXA-88, TEM	*aph(3')-VIa, aadA1, strAB*	*ptsP*, fosA,*	50	0	0	60	25
26	A	32	32	32	128	4	2	2	64	++	+++	+++	OXA-51, OXA-23, TEM	*aph(3')-VIa, aadA1, strAB*	*ptsP*,cyaA*, fosA,*	50	33	17	20	38
27	C	32	64	16	2	2	0.5	4	>256	++	+++	+++	OXA-51, OXA-23	Ausente	*ptsP*,cyaA*, fosA,*	50	33	33	20	50
28	B	8	32	16	256	8	2	4	64	++	+++	+++	OXA-51, OXA-23, TEM	*aadA1, strA, strB*	*ptsP*,cyaA*, fosA,*	63	0	17	60	25

ID: identificação dos isolados; OMP: proteínas de membrana externa ([+++]: intensidade da banda igual a cepa padrão, [++]: intensidade da banda uma vez menor à cepa padrão, [+]: intensidade da banda duas vezes menor à cepa padrão, [++++]: intensidade da banda maior à cepa padrão, A: ausência da proteína); P: presença; NI: não identificado/sem sequenciamento; genes com mutação*.

5. DISCUSSÃO

A do presente estudo é a avaliação da terapia combinada para o tratamento de infecções por *A. baumannii* multidroga resistente e a análise de determinantes genéticos atuantes na resistência antimicrobianas e virulência por métodos diferenciados como o sequenciamento genético.

Nos últimos anos, *A. baumannii* produtor de oxacilinases tem sido cada vez mais relatado em países asiáticos (IRFAN, 2011) e em muitos outros países, incluindo o Brasil, e está associado com a resistência à carbapenêmicos (GROSSO, 2011; CHAGAS, 2014).

Avanços na tecnologia de sequenciamento do genoma revolucionaram o estudo da resistência aos antibióticos. Essas novas ferramentas são capazes de avaliar no mesmo experimento, mecanismos de resistência e patogenicidade dos micro-organismos. Tan e cols (2013) afirmam que alguns métodos laboratoriais podem fornecer informações filogenéticas muito limitadas, e seus resultados podem não identificar distinção genética com os mesmos clones e entre clones diferentes. Assim, o sequenciamento do genoma completo é necessário para análise epidemiológica e determinação de perfis de resistência a antibióticos.

No nosso estudo os genes de resistência e com função de virulência, presentes nos isolados de *A. baumannii,* foram determinados por análise comparativa usando sequencias genéticas depositadas no *GeneBank*. Alguns autores também utilizam ferramentas para comparação das sequencias genéticas, fazendo uso de genomas completos ou parciais, dependendo do objetivo do estudo (TAN, 2013; SAHL, 2013; ZHU, 2013).

Oxacilinases já relatadas em estudos prévios no país foram identificadas em nossos isolados clínicos. Entre os cinco principais subgrupos filogenéticos, os genes $bla_{\text{OXA-51-like}}$, localizados cromossomicamente tem sido utilizado como um marcador específico da espécie para a identificação de *A. baumannii* (TURTON, 2005; FIGUEIREDO, 2011). Este gene foi identificado em todos os isolados do estudo, seguidos da IS*Aba1*. Contudo, a presença de $bla_{\text{OXA-51-like}}$ não se correlaciona com o nível de resistência a carbapenêmicos pois o gene é regulado pela sequência de inserção (IS) IS*Aba1*, indicando que a resistência a carbapenêmicos não pode ser inferida a partir da detecção exclusiva desse gene (CORVEC, 2007). Em contraste, os genes que codificam OXA-23, OXA-24,

e OXA-58 são consistentemente associadas com a resistência ou susceptibilidade reduzida a imipenem, entre essas, OXA-23, apresenta-se como a mais prevalente em *Acinetobacter* spp. em todo o mundo (D´AREZZO, 2011). No Brasil, *A. baumannii* tornou-se particularmente problemático devido à sua prevalência e a resistência a carbapenem, geralmente decorrente de oxacilinase, a maioria envolvendo produtores de OXA-23 (CHAGAS, 2009).

A OXA-23 foi identificada em 45% dos nossos isolados (n=20). Essa enzima foi bastante relatada em estudos brasileiros, em especial nas regiões sul e sudeste (DALLA-COSTA, 2003; GROSSO, 2011; CHAGAS, 2014), assim como em outros países (ROLAIN, 2016). Estudos anteriores realizados no Brasil revelam um aumento da incidência de surtos hospitalares causadas por *A. baumannii* MDR, em um estudo realizado de janeiro de 2006 a setembro de 2007, em oito hospitais no Rio de Janeiro, mostrou que entre 110 isolados de *A. baumannii* resistente ao imipenem, 87.3% eram produtores de OXA-23 (CARVALHO, 2009). Assim como o estudo de Cortivo e cols (2015) que evidenciou que 87,3% dos isolados de *A. baumannii* carreavam ambos os genes $bla_{\text{OXA-23-like}}$ e $bla_{\text{OXA-51-like}}$. Outro estudo brasileiro analisou as características genotípicas de 46 isolados *A. baumannii* MDR de oito hospitais do Estado do Paraná e descreveu que todos os isolados carreavam o $bla_{\text{OXA-23-like}}$ (CIESLINSKI, 2013).

Outra carbapenemase presente nos nossos isolados foi a OXA-143 detectada desde 2004 no país (HIGGINS, 2009) com três variantes relatada atualmente (GIRLICH, 2014; ZANDER, 2014). Alguns estudos brasileiros relatam a presença da OXA-143, como reportado por Antonio e cols (2011) que avaliaram 30 isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos e mostraram que 70% dos isolados carregavam o gene $bla_{\text{OXA-143}}$. Por outro lado, Werneck e cols (2011) avaliaram 83 isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos de 17 hospitais encontrando o gene $bla_{\text{OXA-143}}$ em apenas 8.4% das cepas. Portanto, a importância de $bla_{\text{OXA-143}}$ no país precisa ser mais bem explorada.

Por meio da análise do genoma completo também identificamos um gene codificador de OXA-88, relacionada ao OXA-51, com uma diferença de 5 a 8 aminoácidos. Essa oxacilinase foi descrita por KOH e cols (2007) em Singapura, mas não havia sido identificada anteriormente no Brasil. Da mesma forma, estudo conduzido por Liu e cols (2014), determinou a presença de genes de resistência e grandes variações genéticas relacionadas as ilhas genômicas em isolados de *A. baumannii*.

No presente estudo foi observado a presença de oxacilinases e metalo-β-lactamase como IMP em isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. Contudo, entre as carbapenemases, as metalo-β-lactamases tem um maior impacto na concentração inibitória mínima. As metalo-β-lactamases conferem um elevado nível de resistência e seus genes podem ser transferidos horizontalmente (WALSH, 2008). No entanto, poucos estudos relatam a presença de IMP nos isolados de *A. baumannii* no Brasil. *Acinetobacter baumannii* produtor de IMP-1 tem sido restrito em alguns hospitais do estado de São Paulo (GALES, 2003; MENDES, 2007). Recentemente uma nova classe, IMP-10 foi reportado por Cayô e cols (2015) em isolados de *A. baumannii* de um hospital terciário de São Paulo.

Outro estudo de sequenciamento genômico que determinou diferentes genes relacionados a resistência antimicrobiana em *A. baumannii* foi realizado por Ou e cols (2015), nesse estudo foram descritos genes relacionados a bomba de efluxo, também responsáveis pela resistência a diversas classes de antimicrobianos (COYNE, 2010; ROSENFELD, 2012; YOON, 2013). O mesmo foi observado no estudo atual, por exemplo, três conjuntos de sistemas de bombas de efluxo da família RND (AdeABC, AdeFGH e AdeIJK) e seus respectivos reguladores (AdeRS, AdeN e AdeL).

No presente estudo foram analisadas as três proteínas de membrana externa mais comumente relatados em *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos, OMP 43 kDa, 33-36 kDa e 29 kDa (CATEL-FERREIRA, 2012). A OmpD, de 43 kDa, esteve ausente em quatro isolados do presente estudo, os respectivos isolados apresentaram CIM elevado para os carbapenêmicos, imipenem e meropenem, e efeito sinérgico de combinações com carbapenêmicos não foi observado para um isolado que apresentou ausência tanto da OMP 29 kDa como da OMP 43 kDa. A relação entre proteínas de membrana externa e efeito das combinações antimicrobianas não é relatada em estudos de avaliação do efeito sinérgico. No entanto a ausência de proteínas envolvidas com a resistência a carbapenêmicos pode estar envolvida com a ausência de resultados sinérgicos nas combinações com carbapenêmicos.

A resistência a fosfomicina deste estudo foi interpretada considerando diferentes mecanismos de resistência a fosfomicina de outras espécies Gram-negativas, tais como *E. coli* e *P. aeruginosa*. Mecanismos de resistência a fosfomicina não são descritos em *A. baumannii*. O principal mecanismo de resistência a fosfomicina em *E. coli* ocorre devido mutações nos genes *ptsI* e *cyaA* relacionados com o nível de cAMP (adenosina

monofosfato cíclico), que precisam estar associados aos substratos para expressão dos genes do sistema de transporte. Também a fosfomicina pode inativar a enzima MurA por ligação ao sítio ativo do resíduo de Cys115 (ZHU, 2012). Aqui, a substituição de Val132Ala de MurA foi identificada em todos os isolados até mesmo no isolado com menor CIM a fosfomicina.

No presente estudo, foi identificado o gene *ptsP* com função sinónima ao *ptsI* em *E. coli*, bem como, o gene *cyaA*, ambos apresentaram uma grande diferença da sequência de aminoácidos, quando comparado com *A. baumannii* ATCC 19606, sugerindo uma possível mutação que modifica o sistema de transporte da droga, contudo, nenhuma substituição foi observada quando comparado ao *A. baumannii* MDR-TJ. Também presente nos isolados do atual estudo estão as proteínas FosA e FosX, já relatadas como responsáveis por resistência a fosfomicina em *P. aeruginosa* (BERNAT, 1997).

Em 2010, segundo dados americanos, 45 e 49% dos isolados de *Acinetobacter* eram resistentes a imipenem e meropenem, respectivamente, e a maioria dos isolados, entretanto, permaneceram sensíveis à colistina (QUEENAN, 2012). Na última década houve o aparecimento de isolados resistentes a colistina, mostrando-se cada vez mais frequentes, principalmente após o tratamento de infecções por isolados resistentes a carbapenêmicos (CAI, 2012). O que reforça a necessidade de estudos aprofundados do mecanismo de resistência a polimixinas. Entre os ST determinados no presente estudo, o ST233 (CC113) e ST236 (CC103) já foram relatados em estudo conduzido por Coelho-Souza e cols (2013), dois isolados sendo um sensível e um resistente a colistina, respectivamente, apresentou-se como singletons (ST407), assim como o ST339, os mesmos foram descritos por Clímaco e cols (2013). De acordo com a análise por eBURST os isolados sensíveis a colistina pertenciam ao CC103 e CC283, já os isolados resistentes a colistina ao CC113. A este respeito, a maioria dos isolados de *A. baumannii* OXA-23 reportados na América Latina têm sido comumente relatadas como pertencente aos mesmos complexos clonais (GROSSO, 2011; MARTINS, 2013; RAMÍREZ, 2013; STIETZ, 2013).

Para entender a relação entre mutação e resistência à colistina, substituições de aminoácidos de *pmrA*, *pmrB* e *pmrC* entre isolados sensíveis e resistentes de *A. baumannii* foram avaliados. Alguns estudos relataram que a superexpressão dos genes *pmrA* e *pmrB* é causada por mutação e está envolvido com a resistência a colistina, no entanto,

diferentes sequências de aminoácidos em isolados de *A. baumannii* pode ser devido a diferentes origens genéticas (BECEIRO, 2011; PARK, 2011).

O que reforça nossos resultados onde, tanto os isolados sensíveis como os resistentes mostraram substituições de aminoácidos, e esta substituição foi diferente entre os diferentes tipos de ST. No entanto, a superexpressão foi observada apenas nos isolados resistentes a colistina. Estes resultados podem indicar que a substituição de aminoácidos seja parcialmente responsável pela resistência, porém, a superexpressão dos genes do sistema seja essencial para resistência, dados consistentes com estudo de Park e cols (2011).

Mutações no gene *pmrC* podem levar a superexpressão do mesmo, aumentando consequentemente a produção de fosfoetanolamina, essa mesma hipótese é suportada por diferentes autores (SNITKIN, 2013; ROLAIN, 2011). Alguns estudos relataram substituições de aminoácidos similares ao presente estudo. A substituição de S119T presente no gene *pmrA* dos nossos isolados resistentes a colistina também foram observados no estudo de Arroyo e cols (2011), assim como a substituição e M12K por O´Hara e cols (2013). A mesma substituição de A227V no gene *pmrB* também foi observada no estudo de Adams e cols (2009). Curiosamente nossos isolados resistentes a colistina apresentaram substituição de N116D, a qual não é descrita em estudos prévios.

Para avaliar a expressão dos genes do sistema regulatório PmrCAB nos isolados resistentes a colistina, foi realizado PCRq. Adams e colaboradores (2009) mostraram que nos isolados resistentes a colistina ocorreu tanto a superexpressão do gene *pmrA* quanto deleção parcial do gene *pmrB*. A superexpressão nos genes ocorreu em todos os isolados resistentes a colistina do presente estudo. Por outro lado, a resistência a colistina também pode ser induzida pelo pH ácido e, em menor escala, pela suplementação de Fe^{3+}, é possível que o *pmrB* interage com outras proteínas reguladoras de resposta (Al-KHODOR, 2009). Beceiro e cols (2011), também reportaram aumento da expressão de *pmrA* e *pmrB* em todos os isolados resistentes e observou mudanças no lipídio A com a superexpressão do *pmrC*.

Foram escolhidos isolados sensíveis colistina com perfis distintos por PFGE para observar uma possível diferença entre os mecanismos de resistência e efeito sinérgico. Apesar da origem clonal distinta desses isolados, o efeito sinérgico foi semelhante para os isolados que apresentavam o mesmo mecanismo de resistência.

A avaliação da combinação antimicrobiana tem se mostrado importante para o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes. A natureza e a extensão da interação de drogas são geralmente determinadas em estudos *in vitro*, alguns métodos são utilizados para analisar os dados experimentais da interação, ou seja, sinérgico, indiferente ou antagônicos (ZHAO, 2010). Entretanto, a correlação dos achados *in vitro* com a resposta clínica ainda precisa ser validada em ensaios clínicos controlados.

Uma variedade de métodos para interpretar os resultados do sinergimos pode ser usada e estes métodos podem conduzir a resultados diferentes. Bonapace e cols (2002) analisaram diferentes métodos para interpretar os resultados de *checkerboard* mostrando que a concordância mais baixa foi encontrada entre ensaios de CIF e *time-kill*, essa discrepância entre os dois métodos também foi observada no presente estudo, considerando a padronização de interpretação desejável para diminuir resultados discordantes.

Neste estudo o efeito sinérgico foi observado em ambos os métodos, *checkerboard* e *time-kill*, porém com uma discrepância relevante entre eles. Estudo realizado por Leite e cols (2015), mostra que o método de *time-kill* é padrão ouro para interpretação da avaliação das combinações antimicrobianas contra *A. baumannii,* assim como para outros micro-organismos Gram-negativos. No entanto, o presente estudo mostra a presença de sinergismo em determinados grupos de antimicrobianos, independente dos métodos de avaliação e é possível observar que contra isolados resistentes a colistina o sinergismo é mais frequente quando usado colistina nas combinações.

Estudos anteriores, *in vitro,* mostraram que a proporção de sinergismo de combinações entre colistina-carbapenêmicos contra *A. baumannii* atinge > 80% (ZUSMAN, 2013). Em nosso estudo as combinações de colistina-carbapenêmicos mostram altas taxas de sinergismo principalmente contra os isolados resistentes a colistina.

Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou a combinação de fosfomicina com diferentes classes de antimicrobianos usando *time-kill* contra isolados de *A. baumannii* com diferentes mecanismos de resistência. Um estudo, realizado com oito isolados de *A. baumannii* provenientes do sul da Tailândia em 2008, avaliou a combinação de fosfomicina com imipenem, colistina e sulbactam usando *checkerboard* e *time-kill*, todos foram sensíveis a colistina e mostrou 12,5% de sinergismo para

combinação de fosfomicina e colistina pelo método de *checkerboard* (SANTIMALEEWORAGUN, 2011).

Encontramos frequente efeito sinérgico com fosfomicina e aminoglicosídeos contra isolados de *A. baumannii* sensíveis e resistentes a colistina no presente estudo. No entanto, combinações com fosfomicina e aminoglicosídeos são pouco relatados na literatura. Apenas um estudo mostra a eficácia da combinação de fosfomicina com amicacina, gentamicina e outros antimicrobianas para apenas um isolado de *A. baumannii* (KASTORIS, 2010). Outro estudo realizado por Montgomery e cols (2014), avalia a combinação de fosfomicina-amicacina por um sistema de inalação contra isolados Gram-negativos para tratamento de pneumonias e afirmam que o efeito da combinação é promissor para o tratamento. Contudo, o uso de fosfomicina para tratar infecções por *A. baumannii* é controverso, dados usando fosfomicina intravenosa são escassos. *A. baumannii* geralmente mostram altos níveis de CIM para fosfomicina e pontos de corte não são bem definidos pelo CLSI e EUCAST e o uso isolado dessa droga no tratamento de infecções por *A. baumannii* não é preconizado. (KARAGEORGOPOULOS, 2012; MARTINEZ-MARTINEZ, 1996).

Por outro lado, um estudo publicado recentemente, mostrou que os pacientes que receberam terapia combinada com colistina-fosfomicina tiveram uma resposta microbiológica favorável e menor mortalidade comparada aos pacientes que receberam colistina sozinha (SIRIJATUPHAT, 2014). Assim, o uso de fosfomicina como terapia combinada para o tratamento de *Acinetobacter* spp é promissora *in vitro* e estudos clínicos são muito importantes para estabelecer a sua utilização para o tratamento de infecções causadas por este micro-organismo (SIRIJATUPHAT, 2014).

Existem numerosos dados que suportam a atividade antimicrobiana aumentada quando polimixinas são adicionados a outros agentes antimicrobianos *in vitro*. Uma recente meta-análise concluiu que, contra *A. baumannii*, esta atividade é mais pronunciada quando polimixinas estão combinadas com um carbapenêmico, rifampicina ou glicopeptídeos (NI, 2015).

Aqui foi observado que colistina-rifampicina apresentou um dos maiores efeitos sinérgicos contra isolados resistente a colistina, esta combinação é muito reportada contra isolados de *A. baumannii,* apresentando alto efeito sinérgico (DONG, 2014; LEE, 2016; WEI, 2016) porém pouco relatada em isolados resistentes a colistina. A eficácia das combinações envolvendo colistina contra isolados resistentes a essa droga é apontado

num estudo bastante recente realizado por Hong e cols (2016), que avaliaram o efeito sinérgico entre colistina com rifampicina e carbapenêmicos. A combinação, colistina-rifampicina, é também sugerida como tratamento de *A. baumannii* MDR, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, principalmente relatos de casos (GIAMARELLOS, 2001; SOUHAIL, 2016). Um estudo prospectivo, randomizado, com pequeno número de pacientes que apresentou maior cura microbiológica no grupo da combinação colistina-rifampicina, sendo 71% dos 15 pacientes em comparação com o grupo de colistina sozinha com 59% dos 13 pacientes (AYDEMIR, 2013). Recentemente outro estudo com combinações envolvendo rifampicina evidenciou resultados sinérgicos maiores de 30% contra 73 isolados clínicos de *A. baumannii* MDR (BAI, 2015). Existe um estudo realizado por Li e cols (2007), que mostrou efeito sinérgico para os 17 isolados de *A. baumannii,* provenientes de um hospital da Austrália entre os anos de 2002-2004, resistentes a colistina, o autor afirma que é muito provável que a membrana externa das cepas resistentes a colistina tornam-se mais permeáveis e que, a susceptibilidade aos demais antibióticos aumente.

Combinações com vancomicina também tem mostrado resultados favoráveis contra isolados de *A. baumannii* MDR. Diferentes estudos relataram a atividade da combinação de colistina-vancomicina contra isolados de *A. baumannii* (GORDON, 2010; VIDAILLAC, 2012; O´HARA, 2013). Um deles avaliou seis isolados de *A. baumannii* pelo método do *checkerboard*, sinergismo foi detectado em quatro deles (GORDON, 2010). O outro estudo incluiu apenas três isolados de *A. baumannii* resistente a colistina e mostrou efeito sinérgico para todos os isolados (O´HARA, 2013). O estudo realizado por Vidaillac e cols (2012), mostrou que todas as combinações testadas incluindo colistina-vancomicina foram sinérgicas contra isolados de *A. baumannii* (n = 4) com três linhagens distintas. Apesar do efeito sinérgico ser observado na maioria dos isolados testados, o número de amostra nos estudos foi pequeno, fazendo-se necessário uma avaliação em maior número de cepas para um resultado mais concreto.

De acordo com estes autores, a colistina poderia romper a membrana externa o que facilitaria a penetração do glicopeptídeo através da membrana e expor o sítio alvo da parede celular (GORDON, 2010; O´HARA, 2013). Outro estudo recente com combinações de colistina-vancomicina apresentou resultados sinérgico para 9/10 isolados resistentes a colistina (PERCIN, 2014). O efeito sinérgico de colistina-vancomicina é um resultado interessante, já que, no ambiente de terapia intensiva, a combinação empírica

para paciente séptico geralmente é um beta-lactâmico mais vancomicina e, em hospitais com altos índices de MDR, polimixina é adicionado ao tratamento. Por outro lado, esta combinação pode envolver riscos, tais como insuficiência renal aguda, porém, impacto na mortalidade ainda não foi demonstrada (KALIN, 2012; GARNACHO-MONTERO, 2013). Essa combinação promissora, já foi avaliada em pacientes pediátricos com infecção grave por *A. baumannii* MDR, num período de dois meses em um hospital universitário de Roma, não apresentando efeitos adversos após a administração das drogas combinadas (CECCARELLI, 2015).

No presente estudo, apesar da elevada sensibilidade à tigeciclina, demonstramos que poucas combinações usando tigeciclina apresentavam efeito sinérgico. Alguns estudos apontam que as combinações com tigeciclina não apresentam diferença significantes nas contagens de colônias mesmo após a adição de outras drogas (MUTLU, 2012; DINC, 2013). O efeito sinérgico alcançado, no presente estudo, foi mais comum entre tigeciclina-amicacina, similar ao estudo anterior, relatado por Peterson e cols (2006), que reportam 56% de efeito sinérgico em combinação com tigeciclina. No entanto, dois estudos anteriores reportam a redução no número de contagem de colônias entre 4-6 horas, nas combinações de tigeciclina-amicacina, seguidos de recrescimento após esse período, o mesmo perfil foi observado para nossos isolados com efeito indiferente às combinações com tigeciclina, os autores supõem que uma superexpressão de bomba de efluxo explique o fenômeno (PRINCIPE, 2009; MOLLAND, 2008).

As combinações de colistina-vancomicina, colistina-imipenem, fosfomicina-amicacina tiveram alta taxa de sinergismo contra os isolados de *A. baumannii* MDR produtores de OXA-23. Assim como fosfomicina-amicacina contra *A. baumannii* MDR produtores de OXA-143. No entanto, o uso das combinações antimicrobianas deve ser testado em cenários clínicos pois, as diferenças na epidemiologia de genes de resistência podem influenciar a eficácia do tratamento de combinação de antibióticos. As discrepâncias dos mecanismos de resistência entre isolados de diferentes centros podem explicar, pelo menos em parte, por que esquemas de combinação relatado como bem-sucedida na literatura não foram bem-sucedidas entre os nossos ensaios. Fan e cols (2016), mostraram que nas combinações entre colistina e carbapenêmicos, por exemplo, os efeitos sinérgicos são maiores contra os isolados que apresentam CIM baixas para carbapenêmicos. Assim como, combinações de colistina não apresentam vantagens contra isolados sensíveis a colistina. Zusman e cols (2013) mostraram que a taxa de

sinergismo de colistina combinado com carbapenêmicos contra *A. baumannii* atingiu mais de 80%.

No presente estudo foi possível observar que as combinações com carbapenêmicos foram mais sinérgicas para os isolados produtores de metalo-β-lactamase, assim como, maior sinergismo nas combinações com aminoglicosídeos para os isolados com menor número de AME. Porém, estudos que correlacionam mecanismos de resistência e efeito sinérgico são escassos. Um estudo recente afirma que as combinações de colistina mostram-se mais promissoras contra isolados resistentes a colistina, principalmente em combinações envolvendo carbapenêmicos, rifampicina e glicopeptídeos (BAE, 2016).

Tratando-se da virulência, pouco se sabe sobre o verdadeiro repertório potencial de virulência ou patogenicidade do *A. baumannii*. A habilidade de *A. baumannii* em produzir biofilme é um dos fatores que contribui para sua sobrevivência em ambientes hospitalares, assim como a produção de enzimas e algumas proteínas que facilitam sua aderência e destruição celular (PELEG, 2012). Entre os fatores de virulência que mais se destacam em *A. baumannii* (CHOI, 2005; CHOI, 2008), foram determinados pelo sequenciamento, genes responsáveis pela integridade celular, aderência e formação de biofilme (*ompA, pga*ABCD, *csu*ABCDE, *aba*I,). A OmpA, um membro das proteínas da membrana externa, foi determinada a contribuir, significativamente, para a doença que provoca o potencial do agente patogênico, e contribuir para a apoptose da célula (CHOI, 2005). Genes responsáveis pela codificação de proteínas estruturais do píli desempenham papel importante na colonização, propagação em superfícies e formação do biofilme (TOMARAS, 2003). Um mecanismo para a persistência *A. baumannii* em ambientes hospitalares é a presença de um gene de adesão, envolvidos na formação de biofilme e de pílus, o operon *csuABCDE*. A sua presença tem sido associada com a persistência de *A. baumannii* em superfícies abióticas (TOMARAS, 2003). *A. baumannii* contém o lócus *pgaABCD,* a supressão deste lócus leva a perda do fenótipo de biofilme, esse lócus é responsável pela codificação de polissacarídeos que compõe a matriz externa do biofilme, mantendo a integridade da estrutura (CHOI, 2009).

A expressão de genes com função de virulência não é eficaz em densidades celulares baixos, uma vez que não consegue escapar ao sistema imune do hospedeiro. Em *A. baumannii*, moléculas sinalizadoras de *quorum-sensing*, codificadas pelo gene *abaI*, mostra influência na formação de biofilme, que é um importante fator de virulência responsáveis por sua resistência e sobrevivência em ambientes abióticos (GADDY,

2009). Curiosamente, no presente estudo, isolados resistentes a colistina não apresentaram o gene *abaI*.

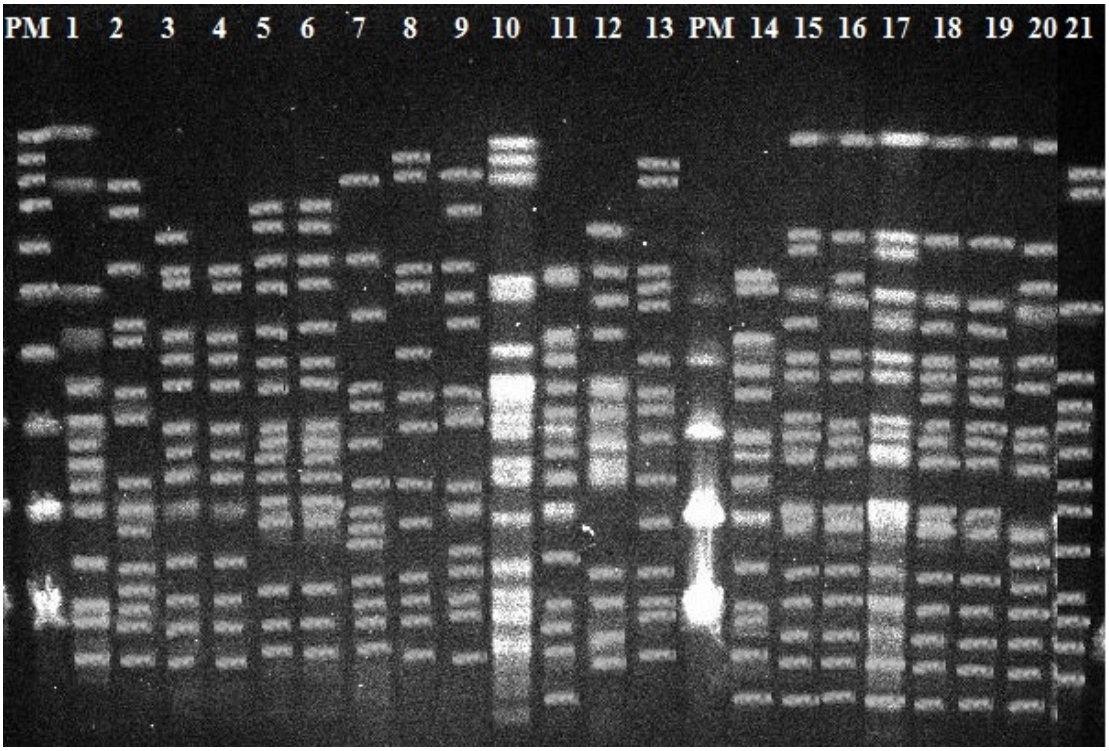
Diferentes reguladores dos genes de virulência já foram identificados em isolados de *A. baumannii* como, por exemplo, GacSA, é um regulador de virulência global de dois componentes essenciais para desenvolvimento de doenças. Mutações no gene *gacS,* sensor kinase, altera a expressão de genes envolvidos com a síntese de píli, motilidade e formação de biofilme, assim como para o regulador BfmRS, responsável por controlar formação de biofilme e aderência celular (CERQUEIRA, 2014). Curiosamente, nos isolados do presente estudo, as substituições de aminoácidos do gene *gacS,* estiveram presente somente entre os isolados resistentes a colistina, e para o gene *bfmS* substituição de aminoácido em todos os isolados.

A comparação dos isolados resistentes a colistina mostrou mutações em alguns genes de virulência. Apesar do isolado 28 pertencer ao mesmo ST dos demais isolados resistentes a colistina, este isolado pertencia a um clone diferente e os outros isolados, apresentam algumas mutações não-sinónimas, principalmente o isolado 25. As mutações presentes nos genes de virulência, envolvidos com formação de biofilme, aderência e captação de ferro não são relatados por outros autores. No entanto, Peleg e cols (2012) afirmam que as espécies que não possuem operons de virulência relacionados, especialmente, ao acinetobactin, podem explicar a sua dificuldade de sobreviver no modelo murino e a sua associação com uma menor mortalidade em estudos clínicos. Contudo, diferentes avaliações são necessárias para confirmação da virulência pelo agente infeccioso.

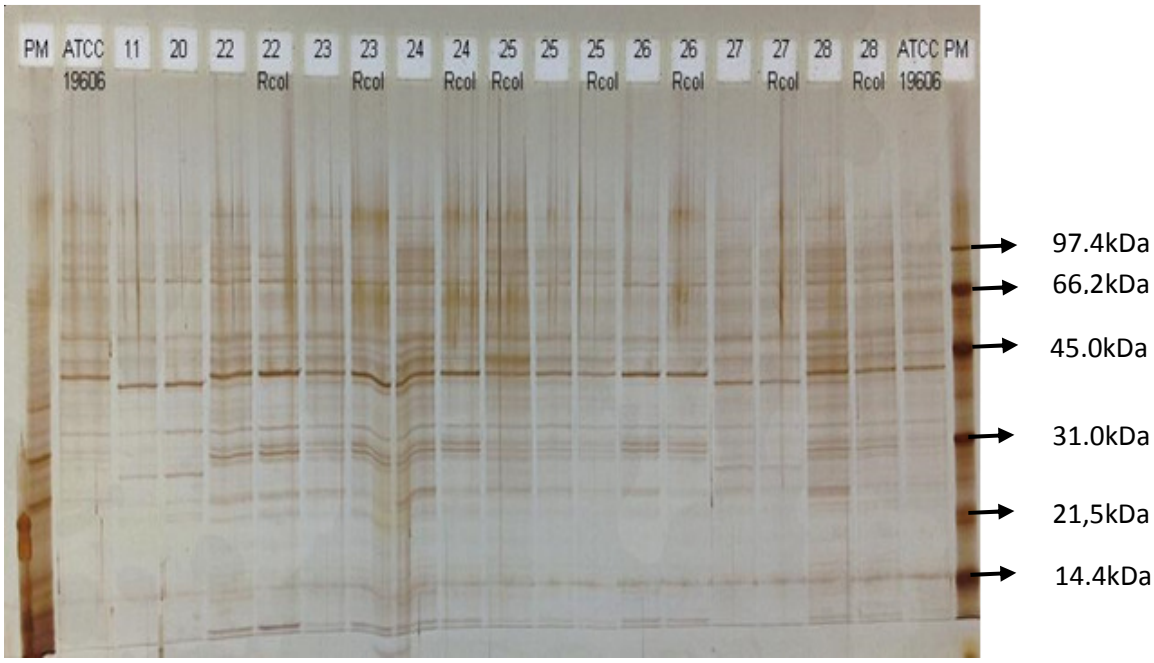
6. CONCLUSÃO

- As combinações antimicrobianas com melhor efeito sinérgico foram observadas entre colistina-rifampicina, colistina-vancomicina e fosfomicina-aminoglicosídeos, podendo ser uma opção de terapia combinada e os mecanismos de resistência parecem estar envolvidos com os efeitos sinérgicos.
- Combinações de diferentes classes de antimicrobianos com colistina apresentaram grande proporção de sinergismo contra isolados de *A. baumannii* resistentes a colistina. Por outro lado, combinações com carbapenêmicos apresentaram maior efeito sinérgico para isolados que apresentaram metalo-β-lactamases.
- Combinações com aminoglicosídeos foram melhores para isolados que apresentaram menor número de enzimas modificadores de aminoglicosídeos e tigeciclina não apresentou bons resultados em combinação apesar de todas as cepas serem sensíveis a este antibiótico.
- A resistência a colistina está envolvida com a superexpressão do gene *pmrA*, porém as mutações nos genes do sistema de dois componentes parecem não se relacionar com a superexpressão.
- A ativação de genes nos isolados resistentes a colistina ocorreu independentemente da presença da droga, indicando que a superexpressão do gene é constitutiva e não induzido pela presença de colistina.
- A resistência aos aminoglicosídeos é decorrente da produção de enzimas modificadores de aminoglicosídeos.
- Fosfomicina mostrou-se resistente por alteração do sistema de transporte GlpT.
- Foram encontrados diferentes genes de virulência envolvidos com formação de biofilme, aderência, produção de enzimas e captação de ferro.
- Os isolados pertenciam a ST236 CC103, ST233 CC113 e ST472 CC283. Os ST407 e ST339 eram singleton, todos previamente descritos no Brasil.
- Os isolados resistentes a colistina, apesar de pertencerem ao mesmo ST, apresentaram mutações em genes de virulência envolvendo formação de biofilme (*bap, csuD, pgaABC*) e também em genes envolvidos com captação de ferro (*bauB, basD, tonB*).

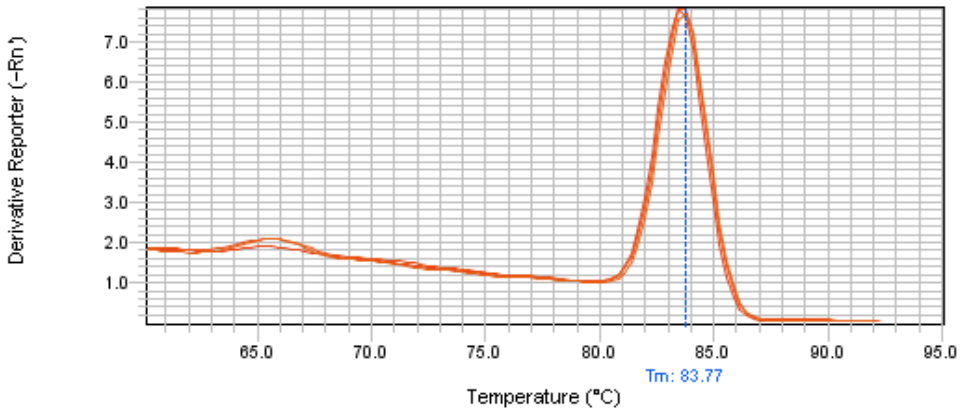
7. ANEXOS



Anexo 1. Eletroforese em gel de campo pulsado realizado com enzima de restrição *ApaI* para os 20 isolados de *A. baumannii*. FMUSP, São Paulo. PM: Peso Molecular; coluna 1: Cepa controle (ATCC 19606); colunas de 2 a 14: respectivos isolados (1, 2, 4, 3, 6, 5, 11, 9, 18, 13, 14, 15 e 20) sensíveis a colistina; colunas de 15 a 21: respectivos isolados (22, 25, 24, 23, 26, 28, 27) resistentes a colistina.



Anexo 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas de membrana externa. PM – Peso Molecular (kDa), 11 e 20 – isolados sensíveis a colistina, 22 a 28 – isolados resistentes a colistina, 22Rcol a 28Rcol – isolados resistentes a colistina cultivados na presença de colistina. FMUSP, São Paulo.



Anexo 3. Curvas de dissociação realizadas no estudo para amplificação do gene de referência 16S para determinação da eficiência do ensaio. FMUSP, São Paulo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, et al. Resistance to colistin in Acinetobacter baumannii associated with mutations in the PmrAB Two-component system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(9):3628-34.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Boletim Informativo: Segurança e qualidade em serviço de saúde n° 9: *Relatório da resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmadas laboratorialmente relacionadas ao uso de cateter venoso central em unidades de terapia intensiva*. 2013.
Accessed on 20 February 2015. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Servicos+de+Saude/Assunto+de+Interesse/Boletim+Seguranca+do+Paciente/Seguranca+e+qualidade+em+servico+de+saude+n+9

Alyamani EJ, Khiyami MA, Booq RY, Alnafjan BM, Altammami MA, Bahwerth FS. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) produced by clinical isolates of Acinetobacter baumannii in Saudi Arabia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14:38.

Al-Khodor S, Kalachikov S, Morozova I, Price CT, Abu Kwaik Y. The PmrA/PmrB two-component system of Legionella pneumophila is a global regulator required for intracellular replication within macrophages and protozoa. *Infect Immun*. 2009;77(1):374–86.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980; 289(1036):321-31.

Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, Elmor de Araújo MR, Lincopan N. High prevalence of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii carrying the blaOXA-143 gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(3):1322-3.

Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L, Hankins JV, Trent MS, Hancock RE. The *pmr*CAB operon mediates polymixin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC

17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipd A. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(8):3743-51.

Arroyo LA, Mateos I, González V, Aznar J. In vitro activities of tigecycline, minocycline, and colistin-tigecycline combination against multi- and pandrug-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii group. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(3):1295-6.

Aydemir H, Akduman D, Piskin N, Comert F, Horuz E, Terzi A, et al. Colistin vs colistin and rifampicin combination in the treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia. *Epidemiol Inf.* 2013;141(6):1214-22.

Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: Rapid annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*. 2008;9(1):75.

Bae S, Kim MC, Park SJ, Kim HS, Sung H, Kim Mn, et al. In vitro synergistic activity of antimicrobial agents in combination against clinical isolates of colistin-resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Sep 6. pii: AAC.00839-16.

Bai Y, Liu B, Wang T, Cai Y, Liang B, Wang R, et al. In Vitro activities of combinations of rifampin with other antimicrobials against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(3):1466-71.

Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C, Pennisi C, et al. Acquisition and spread of Acinetobacter baumannii and Stenotrophomonas maltophilia in intensive care patients. *Int J Hyg Environ Health*. 2009;212(3):330-7.

Bassetti M, Repetto E, Righi E, Boni S, Diverio M, Molinari MP, et al. Colistin and rifampicin in the treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(2):417-20.

Batirel A, Balkan II, Karabay O, Agalar C, Akalin S, Alici O, et al. Comparison of colistin-carbapenem, colistin-sulbactam, and colistin plus other antibacterial agents for the treatment of extremely drug-resistant Acinetobacter baumannii bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(8):1311-22.

Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of Acinetobacter baumannii mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3370-9.

Beceiro A, Moreno A, Fernández N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, et al. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):518-26.

Ben Othman A, Zribi M, Masmoudi A, Abdellatif S, Ben Lakhal S, Frendi C. Multiresistance and endemic status of *Acinetobacter baumannii* associated with nosocomial infections in a Tunisian hospital: a critical situation in the intensive care units. *Braz J Microbiol*. 2011;42(2):415-22.

Bernat BA, Laughlin LT, Armstrong RN. Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochemistry*. 1997;36(11):3050–55.

Bertoncheli CM, Hörner R. Uma revisão sobre metalo-beta-lactamase. *Rev Bras Cienc Farm*. 2008;44(4):577-99.

Bhargava N, Sharma P, Capalash N. Quorum sensing in Acinetobacter: an emerging pathogen. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36(4):349-60.

Biancofiore G, Tascini C, Bisà M, Gemignani G, Bindi ML, Leonildi A, et al. Colistin, meropenem and rifampin in a combination therapy for multi-drug-resistant Acinetobacter baumannii multifocal infection. A case report. *Minerva Anestesiol.* 2007;73(3):181-5.

Biswas S, Mohammad MM, Patel DR, Movileanu L, van den Berg B. Structural insight into OprD substrate specificity. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(11):1108-9.

Bomono RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistant in Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa. *Clin Infec Diseases*. 2006; 43(Suppl 2):S49-56.

Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;44(4):363-6.

Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against Acinetobacter: a comparison with Etest, time-kill and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;38(1):43-50.

Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenem activity in na Acinetobacter baumannii clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1556-61.

Boyd N, Nailor MD. Combination antibiotic therapy for empiric and definitive treatment of gram-negative infections: insights from the Society of Infections Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy.* 2011;31(11):1073-84.

Bradford PA. Extended spectrum beta lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Ver.* 2001;14(4):933-51.

Briceño DF, Correa A, Valencia C, Torres JA, Pacheco R, Montealegre MC, et al. Antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli isolated from tertiary-care hospitals in Colombia. *Biomedica*. 2010;30(3):371-81.

Brossard KA, Campagnari AA. The Acinetobacter baumannii biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun.* 2012;80(1):228-33.

Brown S, Young HK, Amyes SGB. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of Acinetobacter baumannii from Argentina. *Clin. Microbiol. Infect*. 2005;11(1):15–23.

Buijs J, Dofferhoff AS, Mouton JW, Wagenvoort JH, van der Meer JW. Concentration-dependency of beta-lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(4):344-9.

Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(3):259-63.

Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*. 2001;32(7):1085-9.

Bush K, Jacob GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6): 1211-33.

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969–76.

Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of Acinetobacter baumannii: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1607–15.

Candel FJ, Calvo N, Head J, Sánchez A, Matesanz M, Culebras E, et al. A combination of tigecycline, colistin, and meropenem against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii bacteremia in a renal transplant recipient: pharmacodynamic and microbiological aspects. *Rev Esp Quimioter*. 2010;23(2):103-8.

Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD. Dissemination of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34(1):25-8.

Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-β-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(12):4654-61.

Catel-Ferreira M, Nehmé R, Molle V, Aranda J, Bouffartigues E, Chevalier S, et al. Deciphering the function of the outer membrane protein OprD homologue of Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(7):3826-32.

Cayô R, Rodrigues-Costa F, Matos AP, Carvalhaes CG, Jové T, Gales AC. Identification of a new integron harboring bla(IMP-10) in carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3687-9.

Cayô R, Rodríguez MC, Espinal P, Fernández-Cuenca F, Ocampo-Sosa AA, Pascual A, et al. Analysis of genes encoding penicillin-binding proteins in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(12):5907-13.

Ceccarelli G, Oliva A, d'Ettorre G, D'Abramo A, Caresta E, Barbara CS, et al. The role of vancomycin in addition with colistin and meropenem against colistin-sensitive multidrug resistant Acinetobacter baumannii causing severe infections in a Paediatric Intensive Care Unit. *BMC Infect Dis*. 2015;15:393.

Cerqueira GM, Kostoulias X, Khoo C, Aibinu I, Qu Y, Traven A. A global virulence regulator in Acinetobacter baumannii and its control of the phenylacetic acid catabolic pathway. *J Infect Dis*. 2014;210(1):46–55.

Chagas TP, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Characterization of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79(4):468-72.

Chagas TP, Silveira MC, Albano RM, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Draft genome sequence of a multidrug-resistant Acinetobacter baumannii ST15 (CC15) isolated from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(5):691-2.

Chen LF, Chopra T, Kaye KS. Pathogens resistant to antibacterial agents. *Infect Dis Clin North Am*. 2009;23(4):817-45.

Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing Acinetobacter baumannii in China. *J. Antimicrob. Chemother*. 2011;66:1255–9.

Cherkaoui A, Emonet S, Renzi G, Schrenzel J. Characteristics of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strains isolated in Geneva during colonization or infection. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015;14:42.

Chevreux B, Wetter T, Suhai S. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information. *CiteSeer*. 1999;45–56.

Choi AH, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litrán T. The pgaABCD locus of Acinetobacter baumannii encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol*. 2009;191(19):5953-63.

Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, et al. Outer membrane protein 38 of Acinetobacter baumannii localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2005;7(8):1127–38.

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

Cieslinski JM, Arend L, Tuon FF, Silva EP, Ekermann RG, Dalla-Costa LM, et al. Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence-based PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(4):337-40.

Clausell A, Garcia-Subirats M, Pujol M, Busquets MA, Rabanal F, Cajal Y. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. *J Phys Chem B*. 2007;111(3):551-63.

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

Clinical and Laboratory Standard Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-third informational supplement*. CLSI document M100 S23. CLSI, Wayne, PA, USA. 2013.

Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, et al. Occurrence of Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol.* 2006;44(10):3623-27.

Coelho-Souza T, Reis JN, Martins N, Martins IS, Menezes AO, Reis MG, et al. Longitudinal surveillance for meningitis by Acinetobacter in a large urban setting in Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(5):E241-4.

Cortivo GD, Gutberlet A, Ferreira JA, Ferreira LE, Deglmann RC, Westphal GA, et al. Antimicrobial resistance profiles and oxacillinase genes in carbapenem-resistant

Acinetobacter baumannii isolated from hospitalized patients in Santa Catarina, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):699-705.

Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-23 in Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(4):1530-3.

Costa SF, Woodcock J, Gill M, Wise R, Barone AA, Caiaffa H, et al. Outer-membrane proteins pattern and detection of beta-lactamases in clinical isolates of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii from Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;13(3):175-82.

Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-Mediated antibiotic resistance in Acinetobacter spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(3):947-53.

Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Perichon B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(10):4389–93.

Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, et al. Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003;41(7):3403-6.

Dalmarco EM, Blatt SL, Córdova CMM. Identificação Laboratorial de β-lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) – Revisão. *Rev Bras Anal Clin***.** 2006;38(3):171-77.

D'Arezzo S, Principe L, Capone A, Petrosillo N, Petrucca A, Visca P. Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant Acinetobacter baumannii lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(1):54-61.

Delcher AL, Harmon D, Kasif S, White O, Salzberg SL. Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic acids research*. 1999;27(23):4636–41.

de Souza Gusatti C, Bertholdo LM, Otton LM, Marchetti DP, Ferreira AE, Corção G. First occurrence of bla OXA-58 in Acinetobacter baumannii isolated from a clinical sample in Southern Brazil. *Braz J Microbiol*. 2012;43(1):243-6.

Dinc G, Demiraslan H, Elmali F, Ahmed SS, Metan G, Alp E, et al. Efficacy of sulbactam and its combination with imipenem, colistin and tigecycline in an experimental model of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii sepsis. *Chemotherapy*. 2013;59(5):325–9.

Dizbay M, Tozlu DK, Cirak MY, Isik Y, Ozdemir K, Arman D. In vitro synergistic activity of tigecycline and colistin against XDR-Acinetobacter baumannii. *J Antibiot.* 2010;63(2):51-3.

Djeribi, R. Bouchloukh W, Jouenne T, Menaa B. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *Am J Infect Control*. 2012;40(9):854-9.

Doi Y, Murray GL, Peleg AY. Acinetobacter baumannii: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015;36(1):85-98.

Dong X, Chen F, Zhang Y, Liu H, Liu Y, Ma L. In vitro activities of rifampin, colistin, sulbactam and tigecycline tested alone and in combination against extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii. *J Antibiot*. 2014;67(9):677-80.

Durmaz R, Otlu B, Koksal F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of Acinetobacter baumannii, Escherichia coli and Klebsiella spp. *Jpn J Infect Dis*. 2009;62(5):372-7.

Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations, In: Lorian V, *Antibiotics in laboratory medicine*, 4th ed. The Williams & Williams Co. Baltimore. 1996;330-96.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing clinical breakpoints*. Disponível em: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints. 2013.

Evans BA, Amyes SG. OXA β-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(2):241-63.

Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of Acinetobacter baumannii infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Crit Care*. 2006;10(2):R48.

Falagas ME, Lourida P, Poulikakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):654-63.

Falagas ME, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Kapaskelis A, Samonis G. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive non-urinary isolates to fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(5):497–9.

Fan B, Guan J, Wang X, Cong Y. Activity of Colistin in Combination with Meropenem, Tigecycline, Fosfomycin, Fusidic Acid, Rifampin or Sulbactam against Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii in a Murine Thigh-Infection Model. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157757.

Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profile on the activity of carbapenems against clinical isolates of Acinetobacter baumannii. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(3):565-74.

Ferreira AE, Marchetti DP, De Oliveira LM, Gusatti CS, Fuentefria DB, Corção G. Presence of OXA-23-producing isolates of Acinetobacter baumannii in wastewater from hospitals in southern Brazil. *Microb Drug Resist*. 2011;17(2):221-7.

Figueiredo DK, Santos KR, Pereira EM, Schuenck RP, Mendonça-Souza CR, Teixeira LM, et al. First report of the bla(OXA-58) gene in a clinical isolate of Acinetobacter baumannii in Rio de Janeiro Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(3):368-70.

Figueiredo DQ, Castro LFS, Santos KRN, Teixeira LM, Mondino SSB. Detecção de metalo-β-lactamases em amostras hospitalares de Pseudomonas aeruginosa e Acinetobacter baumannii. *J Bras Patol Med Lab.* 2009;3(45):177-84.

Fu Y, Zhou J, Zhou H, Yang Q, Wei Z, Yu Y, Li L. Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clonal complex 22 in multiple cities of China. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(4):644–50.

Fulnecky EJ, Wright D, Scheld WM, Kanawati L, Shoham S. Amikacin and colistin for treatment of Acinetobacter baumannii meningitis. *J Infect*. 2005;51(5):e249-51.

Furtado GH, Cavalcante AC, Medeiros EA, Gales AC, Oliveira VG, Girardelo R. Bloodstream infections with OXA-23-producing Acinetobacter baumannii isolates in a university-affiliated hospital in Brazil: epidemiology and clinical outcomes. *Am J Infect Control.* 2011;39(8):706-8.

Gaddy JA, Actis LA. Regulation of Acinetobacter baumannii biofilm formation. *Future Microbiol.* 2009;4(3):273-8.

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

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(4):699-702.

Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Gutiérrez-Pizarraya A, Espejo-Gutiérrez de Tena E, Artero-González ML, Corcia-Palomo Y, et al. Clinical Efficacy and Safety of the Combination of Colistin plus Vancomycin for the Treatment of Severe Infections Caused by Colistin-susceptible Acinetobacter baumannii. *Chemotherapy*. 2013;59(3):225-31.

Gehrlein M, Leying H, Cullmann W, Wendt S, Opferkuch W. Imipenem resistance in Acinetobacter baumanii is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy*. 1991;37(6):405-12.

Giamarellos-Bourboulis EJ, Xirouchaki E, Giamarellou H. Interactions of colistin and rifampin on multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;40(3):117–20.

Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. Acinetobacter baumannii: a universal threat to public health? *Intern J Antimicrob Agents.* 2008;32(2):106-19.

Girlich D, Damaceno QS, Oliveira AC, Nordmann P. OXA-253, a variant of the carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamase OXA-143 in Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2976-8.

Gonçalves D, Cecilio P, Ferreira H. First detection of OXA-48-like producing Acinetobacter baumannii in the faecal flora of nursing home residents in Northern Portugal, abstr eP748. In: 23rd Eur Congr. *Clin Microbiol Infect Dis.* Berlin, Germany. 2013.

Gooderham WJ, Hancock RE. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33(2):279-94.

Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent Synergy and Sustained Bactericidal Activity of a Vancomycin-Colistin Combination versus Multidrug-Resistant Strains of Acinetobacter baumannii. *Antimicrobial Ag Chemoth*. 2010b;54(12):5316-22.

Gordon NC, Wareham DW. Multi-drug resistant Acinetobcter baumannii: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2010a;35(3):219-26.

Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef AP, Asensi MD, et al. OXA-23-producing Acinetobacter baumannii: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(1):62–5.

Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(6):1317-23.

Harbarth S, Samore MH. Antimicrobial resistance determinants and future control. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(6):794-801.

He X, Lu F, Yuan F, Jiang D, Zhao P, Zhu J, et al. Biofilm Formation Caused by Clinical Acinetobacter baumannii Isolates Is Associated with Overexpression of the AdeFGH Efflux Pump. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(8):4817-25.

Héritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(10):4174-9.

Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5035-8.

Hogg GM, Barr JG, Webb CH. In-vitro activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of Acinetobacter baumannii. *J Antimicrob Chemother.* 1998;41(4):494-5.

Hong DJ, Kim JO, Lee H, Yoon EJ, Jeong SH, Yong D, et al. In vitro antimicrobial synergy of colistin with rifampicin and carbapenems against colistin-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016. pii: S0732-8893(16)30211-5.

Hood MI, Becker KW, Roux CM, Dunman PM, Skaar EP. Genetic determinants of intrinsic colistin tolerance in Acinetobacter baumannii. *Infect Immun*. 2013;81(2):542-51.

Hornsey M, Wareham DW. In vivo efficacy of glycopeptide-colistin combination therapies in a Galleria mellonella model of Acinetobacter baumannii infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(7):3534-7.

Huang L, Sun L, Xu G, Xia T. Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of Acinetobacter baumannii in a Chinese hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(3):326-32.

Irfan S, Turton JF, Mehraj J, Siddiqui SZ, Haider S, Zafar A, et al. Molecular and epidemiological characterisation of clinical isolates of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii from public and private sector intensive care units in Karachi, Pakistan. *J Hosp Infect.* 2011;78(2):143–8.

Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A, Yomoda S, Okubo T, Nakamura A, et al. Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of Pseudomonas aeruginosa and an Alcaligenes xylosoxidans strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):2014–16.

Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, et al. Inactivation of phospholipase D diminishes Acinetobacterbaumannii pathogenesis. *Infect Immun*. 2010;78(5):1952–62.

Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of Acinetobacter. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(11):868-73.

Kalin G, Alp E, Coskun R, Demiraslan H, Gündogan K, Doganay M. Use of high-dose IV and aerosolized colistin for the treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii ventilatorassociated pneumonia: do we really need this treatment? *J Infect Chemother.* 2012;18(6):872-7.

Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(12):751-62.

Karageorgopoulos DE, Wang R, Yu W, Falagas ME. Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(2):255–68.

Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(10):1351-70.

Kastoris AC, Rafailidis PI, Vouloumanou EK, Gkegkes ID, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66(4):359-68.

Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30(4):772-80.

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28(12):1647-9.

Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, et al. MYSTIC Brasil Group. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis*. 2005;9(3):216-24.

Kim CK, Lee Y, Lee H, Woo GJ, Song W, Kim MN, et al. Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible Acinetobacter isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68(4):432-8.

Kim UJ, Kim HK, An JH, Cho SK, Park KH, Jang HC. Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant Acinetobacter infections. *Chonnam Med J.* 2014;50(2):37-44.

Klastersky J, Georgala A. Strategies for the empirical management of infection in cancer patients with emphasis on the emergence of resistant gram-negative bacteria. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014;92(3):268-78.

Kleinheinza KA, Joensenbc KG, Larsena MV. Applying the ResFinder and VirulenceFinder webservices for easy identification of acquired antibiotic resistance and E. coli virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. *Bacteriophage*. 2014;4(1):e27943.

Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. *Infection*. 1983;11(6):315-7.

Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA beta-lactamases in Acinetobacter baumannii from Singapore. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(4):627-32.

Kresse H, Belsey M, Rovini H. The antibacterial drugs market. *Nature Reviews*. 2007;6(1):19-20.

Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(10):1486-513.

Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(3):449-65.

Laranjeira Vdos S, Marchetti DP, Steyer JR, Corção G, Picoli SU. Investigation of metallo-beta-lactamase-producing Acinetobacter sp and Pseudomonas aeruginosa at an emergency hospital in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(4):462-4.

Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1355-61.

Lastoria LC, Caldeira SM, Moreira RG, Akazawa RT, Maion JC, Fortaleza CM. Ecological competition and the incidence of Acinetobacter baumannii bloodstream infections in a teaching hospital in Southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(5):583-8.

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(7):1584-90.

Le Minh V, Thi Khanh Nhu N, Vinh Phat V, Thompson C, Huong Lan NP, Thieu Nga TV, et al. In vitro activity of colistin in antimicrobial combination against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolated from patients with ventilator-associated pneumonia in Vietnam. *J Med Microbiol*. 2015;64(10):1162-9.

Lee CH, Tang YF, Su LH, Chien CC, Liu JW. Antimicrobial effects of varied combinations of meropenem, sulbactam, and colistin on a multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolate that caused meningitis and bacteremia. *Microb Drug Resist*. 2008;14(3):233-7.

Lee H, Hsu FF, Turk J, Groisman EA. The PmrA-regulated pmrC gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymixin resistance in Salmonella enteric. *J Bacteriol*. 2004;186(3):4124-33.

Lee HJ, Bergen PJ, Bulitta JB, Tsuji B, Forrest A, Nation RL, et al. Synergistic activity of colistin and rifampin combination against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(8):3738-45.

Lee H, Roh KH, Hong SG, Shin HB, Jeong SH, Song W, et al. In Vitro Synergistic Effects of Antimicrobial Combinations on Extensively Drug-Resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii Isolates. *Ann Lab Med*. 2016;36(2):138-44.

Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from Acinetobacter baumannii clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(11):4485-91.

Lee Y, Bae IK, Kim J, Jeong SH, Lee K. Dissemination of ceftazidimeresistant Acinetobacter baumannii clonal complex 92 in Korea. *J. Appl. Microbiol*. 2012;112(6): 1207–11.

Leite GC, Perdigão-Neto LV, Gaudereto JJ, Carrilho CMDM, Rossi F, Levin AS, et al. Effect of Antibiotics Combination and Comparison of Methods for Detection of Synergism in Multiresistant Gram-Negative Bacteria. *J Infect Dis Ther*. 2015;3:207.

Liang W, Liu XF, Huang J, Zhu DM, Li J, Zhang J. Activities of colistin- and minocycline-based combinations against extensive drug resistant Acinetobacter baumannii isolates from intensive care unit patients. *BMC Infect Dis.* 2011;11:109.

Li H, Liu F, Zhang Y, Wang X, Zhao C, Chen H, et al. Evolution of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii revealed through whole-genome sequencing and comparative genomic analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(2):1168-76.

Li J, Nation RL, Owen RJ, Wong S, Spelman D, Franklin C. Antibiograms of multidrug-resistant clinical Acinetobacter baumannii: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. *Clin Infect Dis*. 2007;45(5):594-8.

Lim TP, Ledesma KR, Chang KT, Hou JG, Kwa AL, Nikolaou M, et al. Quantitative assessment of combination antimicrobial therapy against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2898-904.

Limansky AS, Mussi SA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in Acinetobacter baumannii is associated with imipenem-resistance. *J Clil Microbiol.* 2002;40(12):4776-8.

Liou ML, Soo PC, Ling SR, Kuo HY, Tang CY, Chang KC. The sensor kinase BfmS mediates virulence in Acinetobacter baumannii. *J Microbiol Immunol Infect* 2014;47(4):275–81.

Liu F, Zhu Y, Yi Y, Lu N, Zhu B, Hu Y. Comparative genomic analysis of Acinetobacter baumannii clinical isolates reveals extensive genomic variation and diverse antibiotic resistance determinants. *BMC Genomics*. 2014;15:1163.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Livermore DM. β-lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(4):557-84.

Livermore DM. Mechanism of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scan J Infect Dis* Suppl. 1991;78:7:16.

Livermore DM. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002;3(2):218-24.

Livermore DM, Woodford N. The β-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends in Microbiology*. 2006;14(9):413-20.

Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an Acinetobacter baumannii biofilm-associated protein. *J Bacteriol*. 2008;190(3):1036-44.

Lyon JA. Imipenem/cilastatin: the first carbapenem antibiotic. *Drug Intell Clin Pharm*. 1985;19(12):895–99.

Maiden MC. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2006;60:561–88.

Majewski P, Wieczorek P, Ojdana D, Sacha PT, Wieczorek A, Tryniszewska EA. In vitro activity of rifampicin alone and in combination with imipenem against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii harboring the blaOXA-72 resistance gene. *Scand J Infect Dis.* 2014;46(4):260-4.

Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two component system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(9):3298-304.

Martínez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(4):647-79.

Martinez-Martinez L, Rodriguez G, Pascual A, Suárez AI, Perea EJ. In vitro activity of antimicrobial agent combinations against multidrug resistant Acinetobacter baumannii. *J Antimicrob Chemother.* 1996;38(6):1107-8.

Martins N, Martins IS, de Freitas WV, de Matos JA, Girão VB, Coelho-Souza T, et al. Imported and Intensive Care Unit-Born Acinetobacter baumannii clonal complexes: one-year prospective cohort study in intensive care patients. *Microb Drug Resist*. 2013;19(3):216-23.

Martins N, Martins IS, de Freitas WV, de Matos JA, Magalhães AC, Girão VB, et al. Severe infection in a lung transplant recipient caused by donor-transmitted carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. *Transpl Infect Dis*. 2012;14(3):316-20.

Marymont JJJr, Marymont J. Laboratoty evaluation of antibiotic combinations: a review of methods and problems. *Lab Med.* 1981;12:47-55.

Medeiros M, Antonio C, Neves P, Mamizuka E, Lincopan N. Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii strain carrying bla_{oxa-72}, bla_{oxa-58}, bla_{oxa-23} and $bla_{oxa-143}$ oxacilinases genes in southeastern Brazil. In: *2° Simpósio Internacional de Microbiologia Clinica.* Florianópolis, Resumo ID:102-2; 2010.

Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):544-7.

Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in Acinetobacter baumannii ismediated by complete loss of lipopolysaccharide. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):4971-7.

Moland ES, Craft DW, Hong S, Kim S, Hachmeister L, Sayed SD, et al. In vitro activity of Tigecycline against Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii and Selection of Tigecycline-Amikacin Synergy. *Antimicrob Ag Chemot.* 2008;52(8):2940-2.

Montero A, Ariza J, Corbella X, Doménech A, Cabellos C, Ayats J, et al. Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in a mouse pneumonia model. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(6):1085-91.

Montgomery AB, Rhomberg PR, Abuan T, Walters KA, Flamm RK. Potentiation effects of amikacin and fosfomycin against selected amikacin-nonsusceptible Gram-negative respiratory tract pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):3714-9.

Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter spp*. isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(5):396-401.

Mostachio AK, van der Heidjen I, Rossi F, Levin AS, Costa SF.. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant Acinetobacter spp. *J Med Microbiol.* 2009;58(11):1522-4.

Motaouakkil S, Charra B, Hachimi A, Nejmi H, Benslama A, Elmdaghri N, et al. Colistin and rifampicin in the treatment of nosocomial infections from multiresistant Acinetobacter baumannii. *J Infect.* 2006;53(4):274-8.

Mutlu YE, Sunbul M, Aksoy A, Yilmaz H, Guney AK, Guvenc T. Efficacy of tigecycline/colistin combination in a pneumonia model caused by extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(4):332–6.

Ni W, Shao X, Di X, Cui J, Wang R, Liu Y. In vitro synergy of polymyxins with other antibiotics for Acinetobacter baumannii: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(1):8-18.

Ni W, Cui J, Liang B, Cai Y, Bai N, Cai X, et al. In vitro effects of tigecycline in combination with colistin (polymyxin E) and sulbactam against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *J Antibiot.* 2013;66(12):705-8.

Nigro SJ, Hall RM. Tn6167, an antibiotic resistance island in an Australian carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii GC2, ST92 isolate. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(6):1342–6.

O'Hara JA, Ambe LA, Casella LG, Townsend BM, Pelletier MR, Ernst RK, et al. Activities of vancomycin-containing regimens against colistin-resistant Acinetobacter baumannii clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2103-8.

Opazo CA, Mella SM, Domínguez MY, Bello HT, González GR. Multi-drug efflux pumps and antibiotic resistance in Acinetobacter baumannii. *Rev Chil Infect*. 2009;26(6): 499-503.

Organização Mundial da Saúde (OMS) - World Health Organization. *WHO Global strategy for containment of antimicrobial resistance*. WHO/CDS/CSR/DRS. Geneva, 2001.

Ou HY, Kuang SN, He X, Molgora BM, Ewing PJ, Deng Z, et al. Complete genome sequence of hypervirulent and outbreak-associated Acinetobacter baumannii strain LAC-4: epidemiology, resistance genetic determinants and potential virulence factors. *Sci Rep*. 2015;2(5):8643.

Ozbek B, Otük G. In vitro activities of tigecycline alone and in combination with colistin sulfate or sulbactam against carbapenem-susceptible and -resistant Acinetobacter baumannii strains isolated from Intensive Care Units. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36(2):191-2.

Pachón-Ibáñez ME, Docobo-Pérez F, López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, Jiménez-Mejias ME, García-Curiel A, et al. Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1165-72.

Pagano M, Barin J, Martins AF, Zavascki AP. High Endemic Rates of OXA-23-Producing Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Caused by the Persistence of Major Clones in Hospitals in a Brazilian City 5 Years After an Outbreak. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015;36(7):860-2.

Pankuch GA, Lin G, Seifert H, Appelbaum PC. Activity of meropenem with and without ciprofloxacin and colistin against Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(1):333-6.

Pantopoulou A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Raftogannis M, Tsaganos T, Dontas I, Koutoukas P, et al. Colistin offers prolonged survival in experimental infection by multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: the significance of co-administration of rifampicin. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29(1):51-5.

Park AJ, Krieger JR, Khursigara CM. Survival proteomes: the emerging proteotype of antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2016b;40(3):323-42.

Park GC, Choi JA, Jang SJ, Jeong SH, Kim CM, Choi IS, et al. In Vitro Interactions of Antibiotic Combinations of Colistin, Tigecycline, and Doripenem Against Extensively Drug-Resistant and Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii. *Ann Lab Med*. 2016a;36(2):124-30.

Park YK, Choi JY, Shin D, Ko KS. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in Acinetobacter baumannii. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(6):525–30.

Pasteran F, Albornoz E, Faccone D, Gomez S, Valenzuela C, Morales M, et al. Emergence of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in Guatemala. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(7):1795-7.

Peck KR, Kim MJ, Choi JY, Kim HS, Kang CI, Cho YK, et al. In vitro *time-kill* studies of antimicrobial agents against blood isolates of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii, including colistin- or tigecycline-resistant isolates. *J Med Microbiol.* 2012;61(3):353-60.

Peleg AY, de Breij A, Adams MD, Cerqueira GM, Mocali S, Galardini M, et al. The success of acinetobacter species; genetic, metabolic and virulence attributes. *PLoS One*. 2012;7(10):e46984.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):538–82.

Percin D, Akyol S, Kalin G. In vitro synergism of combinations of colistin with selected antibiotics against colistin-resistant Acinetobacter baumannii. *GMS Hyg Infect Control*. 2014;9(2):14.

Percin D, Selcan Akyol, and Gamze Kalin. In vitro synergism of combinations of colistin with selected antibiotics against colistin-resistant Acinetobacter baumannii. *GMS Hyg Infect Control.* 2014;9(2):14.

Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by chequerboard and *time-kill* kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(3):573-6.

Petrosillo N, Chinello P, Proietti MF, Cecchini L, Masala M, Franchi C, et al. Combined colistin and rifampicin therapy for carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii infections: clinical outcome and adverse events. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(8):682-3.

Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld KP, et al. Molecular characterization of blaNDM-1 in an Acinetobacter baumannii strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(9):1998-2001.

Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. In: *Antimicrobial combinations. Antibiotics in laboratory medicine*. Lorian V, 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins. 2005.

Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TP, Carvalho-Assef AP, et al. First Report of NDM-1-Producing Acinetobacter baumannii Sequence Type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(12):7592–94.

Poirel L, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D -lactamase involved in resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii. Antimicrob. *Agents Chemother*. 2005;49(1):202–8.

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

Pongpech P, Amornnopparattanakul S, Panapakdee S, Fungwithaya S, Nannha P, Dhiraputra C, et al. Antibacterial activity of carbapenem-based combinations againts multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *J Med Assoc Thai.* 2010;93(2):161-71.

Principe L, Arezzo SD, Capone A, Petrosillo N, Visca P. In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant Acinetobacter baumannii. *Annal Clin Microbiol and Antimicrob*. 2009;8:18.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):440-58.

Queenan AM, Pillar CM, Deane J, Sahm DF, Lynch AS, Flamm RK, et al. Multidrug resistance among Acinetobacter spp. in the USA and activity profile of key agents: results from CAPITAL Surveillance 2010. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(3):267–70.

Ramírez MS, Vilacoba E, Stietz MS, Merkier AK, Jeric P, Limansky AS, et al. Spreading of AbaR-type genomic islands in multidrug resistance Acinetobacter baumannii strains belonging to different clonal complexes. *Curr Microbiol.* 2013;67(1):9-14.

Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(2):223-32.

Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β-lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis*. 2010;2(3):263-74.

Rodriguez CH, De Ambrosio A, Bajuk M, Spinozzi M, Nastro M, Bombicino K, et al. In vitro antimicrobials activity against endemic Acinetobacter baumannii multiresistant clones. *J Infect Dev Ctries*. 2010;4(3):164-7.

Rolain JM, Loucif L, Al-Maslamani M, Elmagboul E, Al-Ansari N, Taj-Aldeen S, et al. Emergence of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii producing OXA-23 Carbapenemase in Qatar. *New Microbes New Infect*. 2016;23(11):47-51.

Rolain JM, Roch A, Castanier M, Papazian L, Raoult D. Acinetobacter baumannii resistant to colistin with impaired virulence: A case report from France. *J Infect Dis.* 2011;204(7):1146–7.

Rosenfeld N, Bouchier C, Courvalin P, Perichon B. Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeIJK in Acinetobacter baumannii is regulated by AdeN, a TetR-type regulator. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2504–10.

Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis*. 2011;52(9):1138-43

Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011;475(7356):348-52.

Rumbo C, Tomás M, Fernández Moreira E, Soares NC, Carvajal M, Santillana E, et al. The Acinetobacter baumannii Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect Immun*. 2014;82(11):4666-80.

Rybak MJ, McGrath BJ. Combination antimicrobial therapy for bacterial infections. Guidelines for the clinician. *Drugs*. 1996;52(3):390–405.

Safari M, Mozaffari Nejad AS, Bahador A, Jafari R, Alikhani MY. Prevalence of ESBL and MBL encoding genes in Acinetobacter baumannii strains isolated from patients of intensive care units (ICU). *Saudi J Biol Sci*. 2015;22(4):424-9.

Sahl JW, Gillece JD, Schupp JM, Waddell VG, Driebe EM, Engelthaler DM, et al. Evolution of a pathogen: a comparative genomics analysis identifies a genetic pathway to pathogenesis in Acinetobacter. *PLoS One*. 2013;8(1):e54287.

Santimaleeworagun W, Wongpoowarak P, Chayakul P, Pattharachayakul S, Tansakul P, Garey KW. In vitro activity of colistin or sulbactam in combination with fosfomycin or imipenem against clinical isolates of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing OXA-23 carbapenemases. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2011;42(4):890-900.

Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(2):234-58.

Schimith Bier KE, Luiz SO, Scheffer MC, Gales AC, Paganini MC, Nascimento AJ, et al. Temporal evolution of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in Curitiba, southern Brazil. *Am J Infect Control*. 2010;38(4):308-14.

Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of Acinetobacter baumannii. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4328-35.

Seki LM, Pereira PS, Conceição MS, Souza MJ, Marques EA, Carballido JM, et al. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. *Braz J Infect Dis*. 2013;17:640-6.

Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a Citrobacter freundii clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(11):4194-7.

Sheng WH, Wang JT, Li SY, Lin YC, Cheng A, Chen YC, et al. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities and synergistic activities of antimicrobial combinations against carbapenem-resistant Acinetobacter spp: Acinetobacter versus Acinetobacter genospecies 3 and 13 TU. *Diag Microbiol Infec Dis*. 2011;70(3):380-6.

Shields RK, Kwak EJ, Potoski BA, Doi Y, Adams-Haduch JM, Silviera FP, et al. High mortality rates among solid organ transplant recipients infected with extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii: using in vitro antibiotic combination testing to identify the combination of a carbapenem and colistin as an effective treatment regimen. *Diag Microbiol Inf Dis.* 2011;70(2):246-52.

Singhai M, Malik A, Shahid M, Malik MA, Goyal R. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. *J Glob Infect Dis*. 2012; 4(4):193-8.

Sirijatuphat R, Thamlikitkul V. Preliminary study of colistin versus colistin plus fosfomycin for treatment of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(9):5598-601.

Smani Y, Pachón J. Loss of the OprD Homologue Protein in Acinetobacter baumannii: Impact on Carbapenem Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1): 677.

Snitkin ES, Zelazny AM, Gupta J; NISC Comparative Sequencing Program, Palmore TN, Murray PR, et al. Genomic insights into the fate of colistin resistance and Acinetobacter baumannii during patient treatment. *Genome Res*. 2013;23(7):1155-62.

Song JY, Lee J, Heo JY, Noh JY, Kim WJ, Cheong HJ, et al. Colistin and rifampicin combination in the treatment of ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(3):281-4.

Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, Biller B, Bannerman T, Balada-Llasat JM, et al. Synergy testing by Etest, microdilution *checkerboard*, and *time-kill* methods for pan-drug-resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4678-83.

Souhail D, Bouchra B, Belarj B, Laila R, Mohammed F, Nassirou OM, et al. Place of Colistin-Rifampicin Association in the Treatment of Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii Meningitis: A Case Study. *Case Rep Infect Dis*. 2016;2016:8794696.

Sun Y, Cai Y, Liu X, Bai N, Liang B, Wang R. The emergence of clinical resistance to tigecycline. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(2):110-6.

Sun Y, Wang L, Li J, Zhao C, Zhao J, Liu M, et al. Synergistic efficacy of meropenem and rifampicin in a murine model of sepsis caused by multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Eur J Pharmacol*. 2014;729:116-22.

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

Tan SY, Chua SL, Liu Y, Høiby N, Andersen LP, Givskov M, et al. Comparative genomic analysis of rapid evolution of an extreme-drug-resistant Acinetobacter baumannii clone. *Genome Biol Evol*. 2013;5(5):807-18.

Tan TY, Lim TP, Lee WHL, Sasikala S, Hsu LY, Kwa ALH. In Vitro Antibiotic Synergy in Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii: the Effect of Testing by Time-kill, Checkerboard, and Etest Methods. *Antimicrob Ag Chemother*. 2011;55(1):436-38.

Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(3):224-8.

Tognim MC, Andrade SS, Silbert S, Gales AC, Jones RN, Sader HS. Resistance trends of Acinetobacter spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Infect Dis*. 2004; 8(5):284-91.

Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by Acinetobacter baumannii: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology.* 2003;149(12):3473–84.

Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Coelho JM, Warner M, Pike R, et al. Detection and typing of integrons in epidemia strains of Acinetobacter baumannii found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3074-82.

Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of Acinetobacter baumannii by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2974-6.

van Hijum SA, Zomer AL, Kuipers OP, Kok J. Projector 2: contig mapping for efficient gap-closure of prokaryotic genome sequence assemblies. *Nucleic acids research*. 2005;33(Web Server issue):W560–6.

Vasconcelos AT, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucarevschi BR, et al. The changing epidemiology of Acinetobacter spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;83(4):382-5.

Vidaillac C, Benichou L, Duval RE. In vitro synergy of colistin combinations against colistin-resistant Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, and Klebsiella pneumoniae isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(9):4856-61.

Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, effluz pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. *J Antimicrobi Chemother*. 2007;59(6):1210-5.

Vila J, Ribera A, Marco R, Ruiz J, Mensa J, Chaves J, et al. Activity of clinafloxacin, compared with six other quinolones, against Acinetobacter baumannii clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(3):471-7.

Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Vindel A, Saez-Nieto JA. Epidemiology of the Acinetobacter-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo-beta-lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of Acinetobacter baumannii from Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(3):550–3.

Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, et al. Dissemination of Acinetobacter baumannii clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian Hospitals. *Antimicrob Agent Chemother*. 2007;51(6):2001-4.

Vourli S, Frantzeskaki F, Meletiadis J, Stournara L, Armaganidis A, Zerva L, et al. Synergistic interactions between colistin and meropenem against extensively drug-resistant and pandrug-resistant Acinetobacter baumannii isolated from ICU patients. Int *J Antimicrob Agents*. 2015;45(6):670-1.

Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21(4):367–371.

Wareham DW, Gordon NC, Hornsey M. In vitro activity of teicoplanin combined with colistin versus multidrug-resistant strains of Acinetobacter baumannii. *J Antimicrobi Chemother.* 2011;66(5):1047-51.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistant in Paseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(1):147-51.

Wei W, Yang H, Liu Y, Ye Y, Li J. In vitro synergy of colistin combinations against extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii producing OXA-23 carbapenemase. *J Chemother*. 2016; 22:1-5.

Werneck JS, Picão RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. OXA-72-producing Acinetobacter baumannii in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(2):452-4.

Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(4):351-3.

Yang H, Huang L, Barnie PA, Su Z, Mi Z, Chen J, et al. Characterization and distribution of drug resistance associated β-lactamase, membrane porin and efflux pump genes in MDR A. baumannii isolated from Zhenjiang, China. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):15393-402.

Ying J, Lu J, Zong L, Li A, Pan R, Cheng C, et al. Molecular epidemiology and characterization of genotypic analysis of Acinetobacter baumannii strains isolates from south China. *Jpn J Infect Dis*. 2015;69(3):180-5.

Yong D, Bell J, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh TR. A novel sub group metallo-β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in Pseudomonas aeruginosa (PSA) from Australia, abstr. C1-593. Abstr. 47th Annu. Intersci. Conf. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-β-lactamase gene, blaNDM=1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India. Antimicrob. *Agents Chemother*. 2009;53(12):5046-54.

Yoon EJ, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii: major role for AdeABC overexpression and AdeRS mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(7):2989-95.

Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple synergistic activities of Polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(3):753-7.

Zago MC, Viana GF, Ecker AB, Nishiyama SA, Zarpellon MN, Dias JR, et al. First report of CTX-M-15-producing Acinetobacter baumannii in Brazil. *J Hosp Infect*. 2016;92(3):298-9.

Zander E, Bonnin RA, Seifert H, Higgins PG. Characterization of blaOXA-143 variants in Acinetobacter baumannii and Acinetobacter pittii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2704-8.

Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries*. 2009;3(5):335-41.

Zhao L, Au JL, Wientjes MG. Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. *Front Biosci* (Elite Ed). 2010;2:241-9.

Zhou H, Zhang T, Yu D, Pi B, Yang Q, Zhou J, Hu S, Yu Y. Genomic analysis of the multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strain MDR-ZJ06 widely spread in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4506-12.

Zhu JY, Yang Y, Han H, Betzi S, Olesen SH, Marsilio F, et al. Functional consequence of covalent reaction of phosphoenolpyruvate with UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase (MurA). *J Biol Chem*. 2012;287(16):12657–67.

Zhu L, Yan Z, Zhang Z, Zhou Q, Zhou J, Wakeland EK, et al. Complete genome analysis of three Acinetobacter baumannii clinical isolates in China for insight into the diversification of drug resistance elements. *PLoS One*. 2013;8(6):e66584.

Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, et al. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):5104–11.

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Antimicrobial Combinations against Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms

Gleice Cristina Leite[1,2], Maura Salaroli Oliveira[1,3], Lauro Vieira Perdigão-Neto[1,2,3], Cristiana Kamla Dias Rocha[2], Thais Guimarães[4], Camila Rizek[2], Anna Sara Levin[1,2,3], Silvia Figueiredo Costa[1,2,3]*

1 Department of Infectious Diseases, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 2 Laboratory of Medical Investigation 54 (LIM-54), São Paulo, Brazil, 3 Hospital Das Clínicas FMUSP, São Paulo, Brazil, 4 Department of Infection Control, Hospital das Clínicas, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

* costasilviaf@ig.com.br

CrossMark

OPEN ACCESS

Citation: Leite GC, Oliveira MS, Perdigão-Neto LV, Rocha CKD, Guimarães T, Rizek C, et al. (2016) Antimicrobial Combinations against Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. PLoS ONE 11(3): e0151270. doi:10.1371/journal.pone.0151270

Editor: Willem van Schaik, University Medical Center Utrecht, NETHERLANDS

Received: September 7, 2015

Accepted: February 25, 2016

Published: March 21, 2016

Copyright: © 2016 Leite et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (GCL) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (SFC).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The study investigated the effect of antibiotic combinations against 20 clinical isolates of *A. baumannii* (seven colistin-resistant and 13 colistin-susceptible) with different resistance mechanisms. Clinical data, treatment, and patient mortality were evaluated. The following methods were used: MIC, PCRs, and outer membrane protein (OMP) analysis. Synergy was investigated using the checkerboard and time-kill methods. Clonality was evaluated by PFGE. Based on clonality, the whole genome sequence of six *A. baumannii* isolates was analyzed. All isolates were resistant to meropenem, rifampicin, and fosfomycin. OXA-23 and OXA-143 were the most frequent carbapenemases found. Four isolates showed loss of a 43kDa OMP. The colistin-susceptible isolates belonged to different clones and showed the highest synergistic effect with fosfomycin-amikacin. Among colistin-resistant isolates, the highest synergistic effect was observed with the combinations of colistin-rifampicin followed by colistin-vancomycin. All colistin-resistant isolates harbored $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$ and belonged to CC113. Clinical and demographic data were available for 18 of 20 patients. Fourteen received treatment and eight patients died during treatment. The most frequent site of infection was the blood in 13 of 14 patients. Seven patients received vancomycin plus an active drug against *A. baumannii*; however, mortality did not differ in this group. The synergistic effect was similar for colistin-susceptible isolates of distinct clonal origin presenting with the same resistance mechanism. Overall mortality and death during treatment was high, and despite the high synergism *in vitro* with vancomycin, death did not differ comparing the use or not of vancomycin plus an active drug against *A. baumannii*.

Introduction

Infections caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* have emerged as a serious problem throughout the world [1]. Old antibiotics, such as fosfomycin and polymyxins, are

now considered potential treatment alternatives to overcome the lack of new antibiotics [2–4]. Studies have demonstrated that fosfomycin is a promising drug, particularly in combination with other antimicrobials for the treatment of infections due to multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacilli. However, there is concern about its use against *A. baumannii*, due to intrinsic resistance to fosfomycin [5–6]. On the other hand, although polymyxins B and E (colistin) are generally active against multidrug-resistant *A. baumannii* (MDRAB) [3] and have been used to treat infections, colistin resistance among *A. baumannii* has been reported and has clearly increased in the last years [4]. In this scenario, treatment with combination therapy, using two or more antibacterial drugs, appears to be the only remaining option [7].

Two of the most frequent *in vitro* methods used to evaluate interactions between drugs are the checkerboard technique and time-kill kinetics. The checkerboard method only evaluates the inhibitory activity, not bactericidal activity. Additionally, it shows different results when different methods of interpretation are used [8]. Thus, its results may require confirmation using a more dynamic interaction method such as time-kill kinetic studies. To date, few studies have evaluated the antimicrobial combinations against pan-resistant *A. baumannii* isolates using both methods, and correlations between *in vitro* and *in vivo* results are often controversial. There is also some concern as to whether the synergistic effect of antibiotics is related to the resistance mechanism or to the clonality of isolates, or both [9]. Thus, data on the synergistic effect of antibiotic combinations and their efficacy in the treatment of infections caused by *Acinetobacter* are needed.

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* activity of antibiotic combinations against twenty MDRAB, including pan-resistant isolates with different resistance mechanisms and clonal origins. In addition, clinical and demographic data of patients submitted to different treatments against these infections were evaluated.

Methods

Bacterial Isolates

Twenty *A. baumannii* isolates were obtained from the bacterial collection of the Laboratory of Bacteriology (LIM-54) of the Department of Infectious Diseases of the School of Medicine, University of São Paulo. Thirteen isolates were colistin-susceptible (at 0.5 mg/L to 2 mg/L) and seven were colistin-resistant (at 8 mg/L to 64 mg/L). Isolates had been stored at -80°C and were subcultured on 5% sheep blood agar before being tested.

Susceptibility testing

Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) of colistin (USP-Reference Standard, Rockville, MD, USA), rifampicin, imipenem, gentamycin, amikacin, tigecycline, fosfomycin, vancomycin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), and meropenem (Astra Zeneca, Cotia, SP, Brazil) were determined using the broth microdilution method in duplicate according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocol [10]. Breakpoints for fosfomycin were used according to EUCAST criteria for *Enterobacteriaceae* [11]. These antibiotics were selected based on local therapeutic protocols used at the Hospital das Clínicas of the University of São Paulo. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as controls for susceptibility testing. Pan-resistance was defined as resistance to all antimicrobials tested, and multidrug-resistance was defined as resistance to at least three antimicrobials tested.

Polymerase chain reaction (PCR)

The PCR techniques for carbapenemase genes ($bla_{OXA-23-like}$; $bla_{OXA-51-like}$; $bla_{OXA-58-like}$; $bla_{OXA-24-like}$; $bla_{OXA-143-like}$; bla_{IMP}; bla_{SPM}; bla_{VIM}; bla_{SIM}; bla_{NDM}), and the genes that encode the omp33-36 porin and *carO* were performed in duplicate; other genes described in *A. baumannii* were verified by whole genome sequence. DNA were extracted using Illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, USA). For each reaction, a positive internal control was used. The primers used in the study are listed on Table 1.

Analysis of outer membrane proteins

Bacterial cells were obtained from overnight Brain Heart Infusion (BHI) cultures of *A. baumannii*. Extraction of outer membrane proteins as well as the analysis of PAGE was performed in duplicate, using a previously described method [12]. *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 was used as a control.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Clonality of *A. baumannii* isolates was evaluated using PFGE with *Apa*I endonuclease (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and chromosomal DNA Ultrapure Agarose (Invitrogen™, Life Technologies) [13]. Restriction fragments were obtained by separation using a CHEF DR®III system (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Patterns were interpreted according to Bionumerics version 7.1 (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Results from our previous study [12] allowed us to select distinct clones of colistin-susceptible isolates, and to examine the possible different synergistic effects. *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 were used as controls.

Whole genome sequencing

Genomic DNA was extracted using the Illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, USA). An Ion Torrent adapter-ligated library was made following the manufacturer's Ion AmpliSeq Library Kit (Life Technologies). The whole-genome sequence was determined using Ion Torrent Personal Genome Technology MachineTM (PGM) system with a 318 chip (Life Technologies, Foster City, CA). Raw sequencing reads were quality-controlled using Trimmomatic [14]. Draft genomes were *de novo* assembled using MIRA [15]. Genome annotation was performed using Prokka [16], and rRNA was identified using RNAmmer [17]. The ResFinder 2.0 server (http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/) was used to identify antibiotic resistance genes. Comparative analysis were made using BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) by alignment and by MAFFT (http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/) to verify amino acid replacement [18].

MLST (Multilocus sequence typing)

MLST was determined by *in silico* analysis of the draft genomes using the *A. baumannii* MLST database (http://pubmlst.org/abaumannii), and Clonal Complexes were analyzed by eBURST software (http://eburst.mlst.net/) [19].

Checkerboard microdilution

The MDR *A. baumannii* isolates were exposed to combinations of two drugs, and checkerboard microdilution testing was performed in duplicate and evaluated after 20–24 hours of incubation at 35°C. Growth and sterility controls were tested in all plates. Colistin, imipenem, fosfomycin, and tigecycline were combined with amikacin, gentamycin, rifampicin,

Table 1. DNA sequences of oligonucleotides used in polymerase chain reactions to detect carbapenemase and outer-membrane proteins of *A. baumannii* isolates.

Oligonucleotides	Sequence (5'-3')	Size (bp)	Reference
bla_{OXA51}—F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	[22]
bla_{OXA51}—R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
bla_{OXA23}—F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	[22]
bla_{OXA23}—R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT		
bla_{OXA24}—F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246	[22]
bla_{OXA24}—R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
bla_{OXA58}—F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	[22]
bla_{OXA58}—R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
bla_{OXA143}—F	AGTTAACTTTCAATAATTG	604	[23]
bla_{OXA143}—R	TTGGAAAATTATATAATCCC		
bla_{SPM}—F	CCTTTTCCGCGACCTTGATC	798	[24]
bla_{SPM}—R	ATGCGCTTCATTCACGCAC		
bla_{SIM}—F	GTACAAGGGATTCGGCATCG	569	[24]
bla_{SIM}—R	GTACAAGGGATTCGGCATCG		
bla_{IMP}—F	TTGGAAAATTATATAATCCC	188	[24]
bla_{IMP}—R	CCAAACCACTAGGTTATC		
bla_{VIM}—F	TTTGGTCGCATATCGCAAAG	382	[24]
bla_{VIM}—R	CCATTCAGCCCAGATCGGCAT		
bla_{NDM}—F	GGCGGAATGGCTCATCACGA	375	[25]
bla_{NDM}—R	CGCAACACAGCCTGACTTTC		
omp33-36—F	CATCGATGGCACTAACATGG	175	[25]
omp33-36—R	AGTGTGACCACCCCAAACAT		
carO—F	GGTTACGGTGGTGCTTTGTT	118	[25]
carO—R	GGTGCGAAACCAAAACCTAA		

doi:10.1371/journal.pone.0151270.t001

vancomycin, and meropenem at the respective minimum inhibitory concentrations determined by microdilution. The antimicrobial agents were diluted from the stock solution, and left at concentrations 4 times higher than the final concentration in plate, and then a serial dilution was performed. FICI and 2-well interpretation methods were used as described by Eliopoulos et al. [20]. FICIs were calculated as [(MIC of drug A in combination)/(MIC of drug A alone)] + [(MIC of drug B in combination)/(MIC of drug B alone)]. Synergy was defined as a FICI of ≤ 0.5, indifference as a FICI of $>0.5<4$, and antagonism as a FICI of ≥ 4. The second method used was the 2-well method, with synergy defined as the absence of growth in wells containing 0.25 x MIC of both drugs and 2 x MIC of both drugs [8, 20].

Time-Kill assay

Time-kill assays were performed in duplicate for all isolates at concentrations based on the MIC determined from the checkerboard testing of isolates as follows: drugs alone and combined at 1 x MIC and 0.5 x MIC. For isolates with indifferent effect and for colistin-resistant isolates, they were performed combined at 0.125 x MIC, 0.25 x MIC, 2 x MIC, and 4 x MIC. Time-kill analysis was performed based on a previously published method [9]. The tests were repeated for the third time with the isolates that had grown at 24 hours. Synergism was interpreted as a $\geq 2 \log_{10}$ decrease in colony count with the antimicrobial combination when compared to the most active single agent. The drug combination was considered to be antagonistic if there was a $\geq 2 \log_{10}$ increase in counts, and the combination was considered to be indifferent

if there was a < 2 $\log_{10}$ increase or decrease in colony count with the combination when compared with the most active drug alone [9].

Clinical and demographic data

The following clinical and demographic data from the medical records of patients hospitalized at Hospital das Clínicas of the University of São Paulo, Brazil, were registered: age, gender, underlying diseases, site of infection, length of stay in the Intensive Care Unit, APACHE II score, and treatment of *A. baumannii* infection (with at least 48 hours of use of a specific antibiotic with activity against *A. baumannii*). Definitions for the infections were those used by the Centers for Disease Control and Prevention [21].

The *in vitro* antimicrobial combinations of vancomycin plus colistin, and vancomycin plus imipenem or meropenem against *A. baumannii* were compared using demographic data. We also evaluated patient mortality during treatment (if the patient was receiving specific treatment for *A. baumannii*) and during hospitalization as outcomes. An Epi Info™ database was built, and results were expressed as means (standard deviation) or median (interquartile range), depending on normality. Statistical analysis was not done due to the limited number of patients. All data were analyzed anonymously and confidentially, with approval by the Research Ethics Committee of the FM-USP (School of Medicine, University of São Paulo).

Results

All 20 isolates of *A. baumannii* were resistant to meropenem, rifampicin, and fosfomycin. All isolates of *A. baumannii* harbored $bla_{OXA-51-like}$, 10 carried the $bla_{OXA-23-like}$ gene, seven carried $bla_{OXA-143-like}$, and three carried the bla_{IMP} gene. The bla_{SPM}, bla_{VIM} and bla_{SIM} genes were not identified by PCR. The bla_{SPM}, bla_{VIM} and bla_{SIM} genes were not identified. Sixteen isolates carried the opm33-36 gene and all isolates carried the *car*O gene. For all the isolates harboring $bla_{OXA-23-like}$, the combination of colistin-vancomycin was synergistic. Synergism was present in 80% with the colistin-imipenem combination, and in 80% with fosfomycin-amikacin. For all the isolates that harbored $bla_{OXA-143-like}$, the fosfomycin-amikacin combination was synergistic, and 85.7% presented synergism for the tigecycline-amikacin combination.

The absence or decrease of outer-membrane proteins of 43 kDa, 33–36 kDa, and 29 kDa of the 20 isolates were compared with *A. baumannii* ATCC 19606. In four colistin-susceptible isolates, a total absence of the protein of 43kDa was observed. These four isolates presented with high MICs for carbapenem and harbored $bla_{OXA-51-like}$, $bla_{OXA-143-like}$, and bla_{IMP}. Table 2 shows the MIC of the antibiotics tested and the resistance mechanisms of *A. baumannii* isolates determined by PCR and OMP evaluation. The interpretation criteria for antimicrobial susceptibility established by CLSI and EUCAST are shown on S1 Table.

The colistin-susceptible *A. baumannii* isolates showed eight distinct profiles and the colistin-resistant isolates showed three distinct profiles by PFGE.

There were two distinct ST profiles among colistin-susceptible isolates; two colistin-susceptible isolates were assigned to ST236 (CC103), and one to ST406 (singleton). The three colistin-resistant isolates were assigned to ST233, a member of the CC113. These ST are unrelated to international clones I, II, and III (Table 3).

Based on the FICI method, the synergistic effect was observed only in one isolate for the colistin-vancomycin combination, and in all colistin resistant isolates (n = 7) for the colistin-rifampicin combination.

All the isolates harboring $bla_{OXA-23-like}$ displayed a synergistic effect of the colistin-vancomycin combination. Four isolates of *A. baumannii*, in which the protein of 43 kDa was absent, had a high MIC for imipenem, and the combinations with carbapenems were

Table 2. Minimum inhibitory concentration of antibiotics and resistance mechanisms of 20 *A. baumannii* isolates.

Isolates	MIC (mg/L)								PCR (OXA/Metallo)				OMP (kDa)		
	Col	Imi	Tig	Gen	Ami	Mer	[a]Rif	[b]Fos	51	23	143	IMP	29	33–36	43
1	2	256	1	32	128	64	4	128	P	A	A	A	+++	+++	+++
2	2	32	0.5	32	128	128	4	128	P	A	A	A	+	+++	+++
3	1	1	1	2	128	128	4	128	P	A	A	A	+++	+++	+++
4	2	32	0.5	64	128	128	4	128	P	A	P	A	+	+++	+
5	2	16	4	128	64	64	4	128	P	A	A	A	+++	++++	+++
6	1	128	1	32	128	128	4	128	P	A	P	P	+	++	A
9	0.5	128	1	16	128	64	8	256	P	A	A	P	+++	+++	+++
11	0.5	64	0.5	2	128	16	4	128	P	P	P	A	+	+++	A
13	0.5	64	0.25	64	128	32	4	128	P	A	P	A	A	+++	A
14	0.5	64	0.5	64	128	64	4	128	P	A	P	P	+	++++	+
15	0.5	128	2	64	128	64	2	128	P	A	A	A	+	+	+
18	1	16	0.5	2	256	16	4	128	P	P	P	A	+++	+++	+++
20	0.5	128	0.5	64	256	128	4	128	P	P	P	A	+	+++	A
22	16	32	2	4	256	32	4	64	P	P	A	A	++	+++	+++
23	16	32	2	4	256	32	2	128	P	P	A	A	++	+++	+++
24	32	32	2	4	512	32	2	64	P	P	A	A	++	+++	+++
25	64	64	16	16	512	32	4	32	P	P	A	A	++	+++	+++
26	32	32	2	4	128	32	2	64	P	P	A	A	++	+++	+++
27	32	64	0.5	2	2	16	4	>256	P	P	A	A	++	+++	+++
28	8	32	2	8	256	16	4	64	P	P	A	A	++	+++	+++

Abbreviations: Col: colistin; Imi: imipenem; Tig: tigecycline; Gen: gentamycin; Ami: amikacin; Mer: meropenem; Rif: rifampicin; Fos: fosfomycin; P: presence; OMP: Outer Membrane Protein; MIC: Minimum Inhibitory Concentration;

[a]Rif: rifampicin, criteria established by EUCAST (breakpoint ≤0.006 mg/L),

[b]Fos: fosfomycin (breakpoint ≤32 mg/L).

doi:10.1371/journal.pone.0151270.t002

indifferent. Also, all isolates presented synergism for the fosfomycin-amikacin and tigecycline-amikacin combinations.

Table 4 shows the effect of antimicrobial combinations by the checkerboard (FICI and 2-well) and time-kill methods of the combinations tested that showed the largest number for synergic effect. In these antimicrobial combinations, synergism was observed in 100% of isolates by the time-kill assay. Antagonism was not noted.

The percentage of synergistic effect using FICI and 2-well for all antimicrobial combinations against *A. baumannii* isolates is shown on Table 5.

The time-kill results confirmed a synergistic effect for all isolates with a synergistic effect by checkerboard. The synergistic effect was observed for almost all isolates by time-kill assay, except for combinations with tigecycline, whose synergistic effect was observed with tigecycline and colistin combinations only for susceptible-colistin isolates. The tigecycline with amikacin combination occurred against 17/20 isolates, and tigecycline with meropenem against ten isolates. For fosfomycin combinations, the synergistic effect was not observed when tested with vancomycin and with meropenem. Fig 1 shows the time-kill curve results.

For all isolates there was a synergistic effect of antibiotic combinations at 2 x MIC and 4 x MIC, except for one isolate using tigecycline-gentamicin and one isolate using colistin-gentamicin. For combinations at 0.125 x MIC and 0.25 x MIC, the synergistic effect was observed only for colistin-vancomycin and colistin-rifampicin.

Table 3. Determination of minimum inhibitory concentration by microdilution, resistance genes, and molecular profile of six *A. baumannii* isolates.

Isolates			*MIC (μg/mL)								MOLECULAR PROFILE			
	Unit/Year	Isolation Site	Col	Imi	Mer	Tig	Ami	Gen	Rif	Fos	Genes	Cluster	ST	CC
03	Clinical ICU* *2003	Blood	1	1	128	1	128	2	4	128	OXA-51, ampC, adeABC, adeIJK, aph(3')-VIa	C	236	103
06	Nursery I2002	Blood	1	128	128	1	128	32	4	128	OXA-51, OXA-182, ampC, IMP, adeABC, adeIJK, aph(3')-VIa, aadA1	C	236	103
18	Nursery II 2004	Blood	1	16	16	0.5	256	2	4	128	OXA-51, OXA-23, OXA-72, ampC, adeABC, adeIJK, aph(3')-VIa	D	407	St
23	Surgical ICU2012	Rectal Swab	16	32	32	2	256	4	2	128	OXA-51, OXA-23, OXA-27, ampC, TEM, adeABC, adeIJK, aph(3')-VIa, aadA1, strA, strB	A	233	133
25	Neurological ICU2011	Blood	64	64	32	16	512	16	4	32	OXA-51, OXA-23, OXA-88, ampC, TEM, adeABC, adeIJK, aph(3')-VIa, aadA1, strA, strB	A2	233	133
28	Surgical ICU2011	Blood	8	32	16	2	256	8	4	64	OXA-51, OXA-23, ampC, TEM, adeABC, adeIJK, aph(3')-VIa, aadA1, strB	B	233	133

*According to CLSI, 2013 and EUCAST, 2013. St: singletons,

**ICU: intensive care unit

doi:10.1371/journal.pone.0151270.t003

A wide diversity of OXA-genes (OXA-51, OXA-23, OXA-72, OXA-88, and OXA-182) was found by whole genome sequencing as well as aminoglycoside resistance genes and genes encoding a series of proteins for the resistance-nodulation-division (RND) family and their regulators (Table 3). This Whole Genome Shotgun project was deposited at the DDBJ/EMBL/GenBank under the accession LMZH00000000 (Ab03), LMBM00000000 (Ab06), LMBN00000000 (Ab18), LMBO00000000 (Ab23), LMBP00000000 (Ab25), and LMBQ00000000 (Ab28). The carbapenem-resistant isolate with the highest MIC for carbapenem co-harbored OXA types and IMP. On the other hand, less diversity of OXA genes was found among colistin-resistant isolates.

Clinical, demographic, and treatment data of 18 patients were evaluated. Of these, three patients were colonized, and one died before the culture result; thus, a total of 14 patients received antibiotic therapy. Eight patients died during treatment and five during hospitalization; therefore, five continued in the investigation. The most frequent site of infection was the blood, in 13/14 patients. Seven patients received vancomycin plus specific therapy (colistin and or ampicillin/sulbactam) against *A. baumannii*; however mortality did not differ for this group compared with the group that did not receive vancomycin, despite the high *in vitro* synergism of colistin-vancomycin (Table 6).

Discussion

The combinations of colistin plus rifampicin, and colistin plus vancomycin showed the highest synergistic effect against colistin-resistant *A. baumannii* isolates. The synergistic effect *in vitro* by time-kill analysis occurred at a concentrations lower (0.5 and 1.0 x of the MIC values) than those used in clinical treatment (2.0 to 8.0 x the MIC values). Mortality among patients during treatment of infections due to MDRAB was high, despite high *in vitro* synergism with vancomycin, considering the use of vancomycin plus an active drug against *A. baumannii*.

Table 4. Results of the three different methods (FICI, 2-well, and time-kill assay) used to evaluate *in vitro* synergism of antibiotic combinations against 20 *A. baumannii* isolates.

Isolates	Main results																	
	Col+Imi			Col+Van			Col+Mer			Col+Rif			Fos+Gen			Fos+Ami		
	[a]FICI	2well	[b]TK	[a]FICI	2well	[b]TK	[a]FICI	2well	[b]TK	[a]FICI	2well	[b]TK	[a]FICI	2well	[b]TK	[a]FICI	2well	[b]TK
1	1.5/I	I	2/2h	0.75/I	S	3/2h	1.25/I	S	2/2h	0.31/S	S	6/2h	1/I	S	3/2h	1.5/I	S	2/2h
2	2/I	I	2/2h	1/I	S	4/2h	2/I	I	2/2h	0.5/S	S	3/2h	2/I	S	3/2h	1.25/I	S	2/2h
3	3/I	I	6/4h	1.5/I	I	3/2h	1/I	I	2/2h	0.5/S	S	6/2h	2/I	S	6/2h	1.25/I	S	2/2h
4	1.5/I	I	2/2h	0.75/I	I	3/2h	2/I	S	2/2h	1.5/I	S	3/2h	2/I	S	4/2h	1.25/I	S	2/2h
5	2/I	I	6/2h	0.75/I	S	3/2h	2/I	I	2/2h	1/I	S	2/2h	1.5/I	I	3/2h	1.5/I	S	3/2h
6	1.5/I	I	2/2h	1.5/I	S	4/2h	1.25/I	S	2/2h	1/I	S	4/2h	1.5/I	S	4/2h	1.25/I	S	2/2h
9	1.5/I	S	2/2h	1.5/I	S	4/2h	2/I	I	2/2h	1/I	I	2/2h	0.562/I	S	4/2h	1.25/I	S	2/2h
11	2/I	I	2/2h	1/I	S	4/2h	2/I	I	2/2h	0.75/I	I	2/2h	2/I	I	3/2h	1.25/I	S	2/2h
13	1.5/I	I	6/2h	2/I	I	4/2h	2/I	I	2/2h	1/I	I	2/2h	1.5/I	S	4/2h	1.5/I	S	2/2h
14	2/I	I	2/2h	1.5/I	I	3/2h	2/I	I	2/2h	1/I	I	2/2h	1.25/I	S	4/2h	2/I	S	2/2h
15	2/I	I	2/2h	1.5/I	S	4/2h	2/I	I	2/2h	1.5/I	I	2/2h	1.5/I	S	2/2h	1.5/I	S	2/2h
18	1.5/I	S	2/2h	2/I	S	4/2h	2/I	I	2/2h	1.25/I	I	2/2h	2/I	I	4/2h	1.5/I	S	2/2h
20	2/I	I	2/2h	0.75/I	S	4/2h	2/I	I	2/2h	1.5/I	I	2/2h	1.5/I	S	3/2h	1/I	S	2/2h
22	0.75/I	S	3/2h	0.625/I	S	4/2h	1.25/I	S	6/2h	0.135/S	S	6/2h	2/I	I	4/2h	1.25/I	S	2/2h
23	0.625/I	S	2/2h	0.507/I	S	4/2h	1.125/I	S	2/2h	0.155/S	S	5/2h	2/I	I	4/4h	1.5/I	S	2/2h
24	1.5/I	S	3/2h	0.625/I	S	6/2h	1.25/I	S	2/2h	0.132/S	S	6/2h	2/I	I	4/4h	1.5/I	S	2/2h
25	2.25/I	S	2/2h	1.125/I	S	6/2h	1/I	S	6/2h	0.135/S	S	3/2h	0.75/I	S	3/2h	1.5/I	S	2/2h
26	0.75/I	S	2/2h	1.062/I	S	5/2h	1/I	S	5/2h	0.135/S	S	6/2h	2/I	I	4/2h	1.5/I	S	2/2h
27	1.25/I	S	4/2h	1.25/I	S	4/2h	1/I	S	6/2h	0.135/S	S	6/2h	1.5/I	S	4/2h	2/I	I	2/2h
28	0.75/I	S	2/2h	0.122/S	S	4/2h	1.062/I	S	2/2h	0.185/S	S	3/4h	1.03/I	S	3/2h	2/I	I	2/2h

Abbreviations: Col: colistin; Imi: imipenem; Mer: meropenem; Gen: gentamycin; Ami: amikacin; Rif: rifampicin; Fos: fosfomycin; I: indifferent; S: synergism; h: hour.

[a]FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index): value/effect;

[b]TK (Time-Kill): log decrease/bactericidal effect hour.

doi:10.1371/journal.pone.0151270.t004

Different interpretation procedures can be used to determine the effect of the antimicrobial combinations, but these methods may lead to different results. Therefore, we chose FICI and 2-well, the most frequently used methods in literature, and the time-kill method, which is considered the gold-standard [26]. We found different results comparing 2-well and FICI as demonstrated by other authors [27]. Bonapace et al. [27] demonstrated a 72% (range 42–97%) agreement between the time-kill test and Etest, and 51% (range 30–67%) between the time-kill and checkerboard tests. Thus, it seems that for clinical purposes, it may be important to confirm checkerboard results with time-kill testing.

To the best of our knowledge, this is the first study that evaluated the synergistic effect of fosfomycin using the time-kill assay against well-characterized colistin-susceptible and resistant *A. baumannii* isolates. We found a synergistic effect with fosfomycin and aminoglycoside against colistin-susceptible and resistant *Acinetobacter* isolates. However, we could not evaluate the use of fosfomycin in our patients because it is not yet approved to be used as systemic treatment in Brazil.

A recent study showed that patients who received combination therapy with colistin and fosfomycin had a significantly more favorable microbiological response and a trend towards more favorable clinical outcomes and lower mortality than those who received colistin alone

Table 5. ***In vitro*** **synergistic effect, according to two different methods (FICI and 2-well) of antimicrobial combinations against 20 isolates of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*.**

Antibiotic	Antibiotic tested in combination	Colistin-Susceptible (n = 13)		Colistin-Resistant (n = 7)	
		*Synergism (%)		*Synergism (%)	
		**FICI	2-Well	**FICI	2-Well
Colistin					
	Imipenem	0	15	0	100
	Tigecycline	0	15	0	0
	Gentamycin	0	23	0	0
	Amikacin	0	15	0	14
	Meropenem	0	23	0	100
	Vancomycin	0	69	14	100
	Rifampicin	23	77	100	100
	Fosfomycin	0	54	0	0
Imipenem					
	Tigecycline	0	31	0	43
	Gentamycin	0	54	0	29
	Amikacin	0	46	0	14
	Vancomycin	0	0	0	0
	Rifampicin	0	39	0	0
	Fosfomycin	0	23	0	0
Tigecycline					
	Gentamycin	0	8	0	29
	Amikacin	0	46	0	14
	Meropenem	0	8	0	29
	Vancomycin	0	8	0	0
	Rifampicin	0	0	0	0
	Fosfomycin	0	0	0	0
Fosfomycin					
	Gentamycin	0	77	0	43
	Amikacin	0	100	0	71
	Meropenem	0	23	0	29
	Vancomycin	0	23	0	14
	Rifampicin	0	39	0	0

*Synergism is a positive interaction; the combined effect of the drugs being examined is significantly greater than the expected result. The isolates that showed no synergistic effect showed indifference; antagonism was not observed for any combination against any isolate tested.

**FICI—Fractional Inhibitory Concentration Index.

doi:10.1371/journal.pone.0151270.t005

[28–29]. Nevertheless, the use of fosfomycin to treat infections due to *Acinetobacter* is controversial. Data using intravenous fosfomycin are scarce, *Acinetobacter* usually shows high MICs, and breakpoints are not well defined by CLSI [10] or EUCAST [11]. Few studies have evaluated the synergistic effect of fosfomycin combined with colistin against *A. baumannii* [30–31], which may vary from 37.5% to 75% [30–31]. Despite all limitations, our data demonstrated a high rate of synergy of fosfomycin-aminoglycoside combinations against colistin-susceptible and resistant *Acinetobacter* isolates. This suggests that these combinations may be clinically useful.

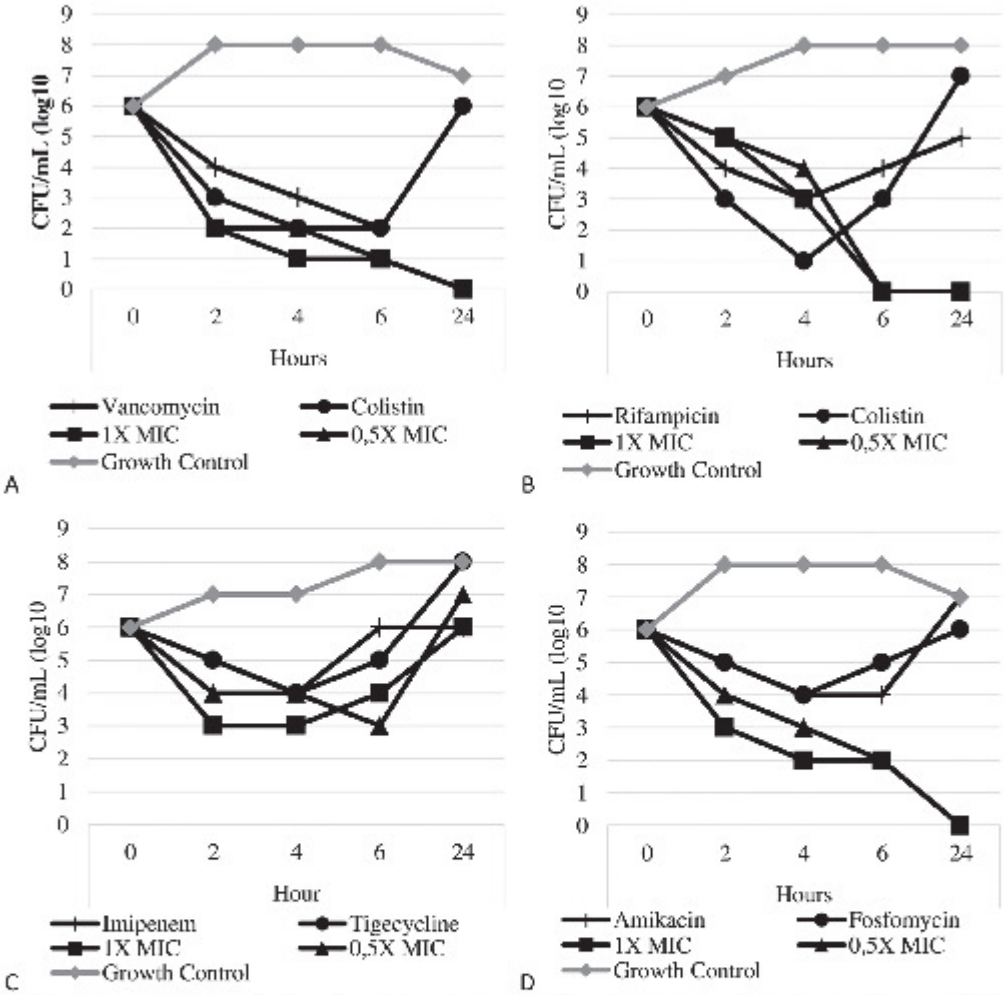


Fig 1. Time-kill curve of isolates using drugs alone and in combination at 1 x MIC and 0.5 x MIC, respectively, against an *A. baumannii* isolate. (A) Isolate 23 –Colistin (16 and 8 mg/L)/Vancomycin (64 and 32mg/L), (B) Isolate 28—Colistin (8 and 4 mg/L)/Rifampicin (4 and 2mg/L), (C) Isolate 1—Imipenem (256 and 128mg/L)/Tigecycline (1 and 0.5mg/L), (D) Isolate 5—Fosfomycin (128 and 64mg/L)/Amikacin (64 and 32mg/L).

doi:10.1371/journal.pone.0151270.g001

In the present study, all colistin-resistant *A. baumannii* isolates harboring $bla_{OXA-23-like}$ belonged to CC113 (ST233). This differed from prior reports that identified colistin-resistance in ST2 of the international clone II [32] and ST375 [33] in Italy and in Korea [32–33]. On the other hand, the colistin-susceptible *A. baumannii* isolates in our study that harbored

Table 6. Clinical, demographic, and vancomycin time-kill synergism data of 18 patients colonized and infected by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.

	Patients N = 18	Surviving during treatment N = 6	Death during treatment N = 8
Age (years), mean (range)	43 (15–68)	38 (16–59)	44 (15–69)
Female	6	5	1
Underlying diseases			
Hematologic cancer	4	0	4
Cirrhosis	3	3	0
Abdominal surgery	2	1	1
Trauma	2	2	0
Kidney transplant	1	1	0
Others	5	2	3
Intensive Care Unit	6	4	2
Apache II, median	16	15	13
Colonization	3	-	-
No treatment	4*	-	-
Infection	14	6	8
Blood	13	6	7
Tracheal secretion	1	-	1
Treated *A. baumannii* infection	14	6	8
In vitro synergism with vancomycin plus colistin by time-kill	14	6	8
In vitro synergism with vancomycin plus imipenem by time-kill	9	4	5
Received vancomycin plus *A. baumannii* treatment	7	2	5

*Three colonization (one blood specimen collected by central venous catheter and two fecal specimens) and one patient with a bloodstream infection that died before treatment.

doi:10.1371/journal.pone.0151270.t006

$bla_{OXA-23-like}$ belonged to CC103 (ST236). This CC has already been reported by Coelho-Souza et al. [34] in 2003 in another state of Brazil. Most OXA-23- producing *A. baumannii* isolates in Latin America belong to CC113, in contrast with studies in many countries around the world that showed that *A. baumannii* harboring OXA-23 isolates were related to specific clones belonging to CC92 [35–42].

OXA-23 and OXA-143 were the most frequent resistance mechanisms found in our isolates. *A. baumannii* harboring OXA-23 has been reported in many countries including Brazil, and it is associated with resistance to imipenem [43–47]. This is the first report of OXA-88 and OXA-182 among clinical isolates of *A. baumannii* in Brazil. OXA-88 sequences differ from OXA-51 by five to eight amino acids. It has been described among clinical isolates in Singapore [48]. OXA-182 has been reported among *A. baumannii* isolates in Korea and revealed 93% nucleotide identity with $bla_{OXA-143}$ [49]. Other carbapenemase found in our isolates was OXA-72, already described in Brazil [50–52].

Outer-membrane proteins of 43 kDa previously associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter* spp. [53] were absent in four isolates analyzed in the present study. These isolates showed a high MIC for imipenem and an indifferent effect of combinations with carbapenem. However, in all isolates, fosfomycin-amikacin and tigecycline-amikacin combinations were synergistic.

In our study, the combination of colistin with rifampicin showed the highest synergistic effect against colistin-resistant *A. baumannii*. This combination has already been suggested for treatment of MDRAB by both *in vitro* and *in vivo* studies, mainly in case series [54]. There is only one prospective small randomized trial that showed a higher rate of microbiological cure

in the colistin and rifampicin combination group (71% of 15 patients) compared to the colistin group (59% of 13 patients) [55]. However, due to the high incidence of tuberculosis infection in our country, the use rifampicin is restricted and not used to treat *A. baumannii* infections.

In this study, we detected a synergistic effect of colistin associated with vancomycin in 80% of isolates by using the 2-well method. These results were confirmed by the time-kill assay, considered the gold standard. Three previous studies reported the activity of a combination of colistin with vancomycin against MDRAB; however, they analyzed a very small number of *A. baumannii* isolates [56–58]. One study evaluated six *A. baumannii* isolates by the checkerboard method [56], and synergism was detected in four. The other study included only three colistin-resistant *A. baumannii* isolates and showed a synergistic effect for all [58]. A study conducted by Vidaillac et al. [57] showed that all tested combinations including colistin-vancomycin were synergistic against four isolates of *A. baumannii*. According to these authors, colistin would disrupt the outer membrane and could facilitate glycopeptide penetration across the outer membrane, thus exposing the target site in the cell wall. The synergistic effect of colistin and vancomycin may be clinically useful in the intensive care setting because the empiric combination for septic patients usually includes a beta-lactam plus vancomycin. In hospitals with high MDR rates, polymyxin is added. On the other hand, this combination may involve risks such as acute kidney damage, and its impact on mortality has not yet been clearly demonstrated [58]. Although we found a high *in vitro* rate of synergism with vancomycin, death among patients who received vancomycin did not differ from that of those who did not receive it. These results could be due to the small number of patients evaluated, as well as the site of infection. The types of resistance mechanism among *A. baumannii* isolates could explain, at least in part, why combination regimens reported as successful in literature were not successful in our assays.

In our study, although we found a high rate of susceptibility to tigecycline (only 5% of isolates were resistant to this antibiotic), few antibiotic combinations using tigecycline showed a synergistic effect. The highest synergistic effect achieved with tigecycline was in combination with amikacin, similar to a prior study reported by Petersen et al. [9]. Thus, it would seem that tigecycline is not a good option to use in a combination to treat infection due to *A. baumannii* harboring OXA-23 and OXA-143, the most frequent resistance mechanisms identified in our isolates.

Our study has several limitations, such as the retrospective design of the study and the number of patients evaluated. We tried to evaluate the impact of "*in vitro* synergism" of vancomycin on death; however, we only had information on 18 patients, and only seven received vancomycin plus specific treatment against *A. baumannii*. The colistin-resistant isolates were closely related, the colistin-susceptible isolates belonged to different clones, but the synergistic effect was similar for isolates showing the same resistance mechanism.

In conclusion, our study demonstrates that colistin plus rifampicin, and colistin plus vancomycin showed the highest synergistic effect against colistin-resistant *A. baumannii* isolates. Among colistin-susceptible isolates, the highest synergistic effect was achieved with fosfomycin combined with amikacin or with gentamycin, and colistin combined with rifampicin or with vancomycin. Moreover, the synergistic effect against MDRAB appears to be related to the resistance mechanism and not to the clonality of isolates. Despite the high synergism *in vitro* with vancomycin, mortality of patients did not differ when comparing the use or not of vancomycin plus an active drug against *A. baumannii*.

Supporting Information

S1 Table. Antimicrobials susceptibility established by CLSI and EUCAST.
(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GCL SFC ASL. Performed the experiments: GCL CKDR CR. Analyzed the data: MSO LVPN TG SFC. Contributed reagents/materials/analysis tools: GCL MSO LVPN CKDR TG CR SFC ASL. Wrote the paper: GCL SFC. Techninical support: CKDR CR.

References

1. Custovic A, Smajlovic J, Tihic N, Hadzic S, Ahmetagic S, Hadzagic H. Epidemiological Monitoring of Nosocomial Infections Caused by Acinetobacter baumannii. Med Arh. 2014; 68(6):402–406.
2. Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, Rafailidis PI. Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34(2):111–120. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.03.009 PMID: 19403273
3. Bishburg E, Bishburg K. Minocycline an old drug for a new century: emphasis on methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Acinetobacter baumannii. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34 (5):395–401. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.06.021 PMID: 19665876
4. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme (2001–2004). Clin Microbiol Infect. 2006; 12(4):315–321. PMID: 16524407
5. Lu CL, Liu CY, Huang YT, Liao CH, Teng LJ, Turnidge JD, Hsueh PR. Antimicrobial Susceptibilities of Commonly Encountered Bacterial Isolates to Fosfomycin Determined by Agar Dilution and Disk Diffusion Methods. Antimicrob Agents and Chemother. 2011; 55(9):4295–4301.
6. Sirijatuphat R, Thamlikitkul V. Preliminary study of colistin versus colistin plus fosfomycin for treatment of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii infections. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58 (9):5598–601. doi: 10.1128/AAC.02435-13 PMID: 24982065
7. Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant Acinetobacter baumannii. Annal Clin Microbiol and Antimicrob. 2009; 8:18.
8. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. In: Antimicrobial combinations. Antibiotics in laboratory medicine. (5th edn). Lorian V, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. 2005.
9. Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by chequerboard and time-kill kinetic analysis. J Antimicrob Chemother. 2006; 57(3):573–6. PMID: 16431863
10. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Nineteenth informational supplement. CLSI document M100 S19. CLSI, Wayne, PA, USA. 2013.
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing clinical breakpoints. Available: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints. 2013.
12. Mostachio AK, van der Heidjen I, Rossi F, Levin AS, Costa SF. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in colistin-susceptible Acinetobacter spp. isolates in Brazil. Int J Antimicrob Agents. 2012; 39(5):396–401. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.01.021 PMID: 22455794
13. Shahcheraghi F, Abbasalipour M, Feizabadi M, Ebrahimipour G, Akbari N. Isolation and genetic characterization of metallo-β-lactamase and carbapenamase producing strains of Acinetobacter baumannii from patients at Tehran hospitals. Iran J Microbiol. 2011; 3(2):68–74. PMID: 22347585
14. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014; 30(15):2114–20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170 PMID: 24695404
15. Chevreux B, Wetter T, Suhai S. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information. 1999;45–56.
16. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 2014; 30(14):2068–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153 PMID: 24642063
17. Lagesen K, Hallin P, Rodland EA, Staerfeldt HH, Rognes T, Ussery DW. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. Nucleic Acids Res. 2007; 35(9):3100–8. PMID: 17452365
18. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution. 2013; 30(4):772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010 PMID: 23329690
19. Maiden MCJ. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 2006; 60:561–88. PMID: 16774461

20. Eliopoulos GM, Moellering RC. In: Antimicrobial combinations. Antibiotic in Laboratory Medicine (4th edn). Lorian V, Williams and Wilkins. Baltimore, MD. 1996;330–96.

21. CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. Am J Infect Control 2008 (36:): 309–32.

22. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 27(4):351–3. PMID: 16564159

23. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53 (12):5035–8. doi: 10.1128/AAC.00856-09 PMID: 19770279

24. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari AC, Tufik S. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. J Clin Microbiol. 2007; 45(2):544–7. PMID: 17093019

25. Mostachio AK, van der Heidjen I, Rossi F, Levin AS, Costa SF. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding Oxacillinases and metallo-b-lactamases in colistin-susceptible Acinetobacter spp. J Med Microbio. 2009; 58:1522–4.

26. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 44(4):363–6. PMID: 12543542

27. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against Acinetobacter baumannii: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000; 38(1):43–50. PMID: 11025183

28. Zhang Y, Chen F, Sun E, Ma R, Qu C, Ma L. *In vitro* antibacterial activity of combinations of fosfomycin, minocycline and polymyxin B on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Experimental Therapeutic Medic. 2013; 5(6):1737–1739.

29. Sirijatuphat R, Thamlikitkul V. Preliminary study of colistin versus colistin plus fosfomycin for treatment of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii infections. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58 (9):5598–601. doi: 10.1128/AAC.02435-13 PMID: 24982065

30. Santimaleeworagun W, Wongpoowarak P, Chayakul P, Pattharachayakul S, Tansakul P, Garey KW. In vitro activity of colistin or sulbactam in combination with fosfomycin or imipenem against clinical isolates of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing OXA-23 carbapenemases. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2011; 42(4):890–900. PMID: 22299471

31. Wei W, Yang H, Liu Y, Ye Y, Li J. In vitro synergy of colistin combinations against extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii producing OXA-23 carbapenemase. J Chemother. 2015 May. doi: 10.1179/1973947815Y.0000000030

32. Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, Quattrocchi A, Bellocchi P, Poulou A et al. Spread of a carbapenem- and colistin-resistant Acinetobacter baumannii ST2 clonal strain causing outbreaks in two Sicilian hospitals. J Hosp Infect. 2014; 86(4):260–6. doi: 10.1016/j.jhin.2014.02.001 PMID: 24680473

33. Kim UJ, Kim HK, An JH, Cho SK, Park KH, Jang HC. Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant Acinetobacter Infections. Chonnam Med J. 2014; 50(2):37–44. doi: 10.4068/cmj.2014.50.2.37 PMID: 25229014

34. Coelho-Souza T, Reis JN, Martins N, Martins IS, Menezes AO, Reis MG et al. Longitudinal surveillance for meningitis by Acinetobacter in a large urban setting in Brazil. Clin Microbiol Infect. 2013; 19(5): E241–4. doi: 10.1111/1469-0691.12145 PMID: 23398654

35. Lee Y, Bae IK, Kim J, Jeong SH, Lee K. Dissemination of ceftazidime-resistant Acinetobacter baumannii clonal complex 92 in Korea. J. Appl. Microbiol. 2012; 112(6):1207–11. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05283.x PMID: 22404202

36. Nigro SJ, Hall RM. Tn6167, an antibiotic resistance island in an Australian carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii GC2, ST92 isolate. J. Antimicrob. Chemother. 2012; 67(6):1342–46. doi: 10.1093/jac/dks037 PMID: 22351684

37. Fu Y, Zhou J, Zhou H, Yang Q, Wei Z, Yu Y, Li L. Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clonal complex 22 in multiple cities of China. J. Antimicrob. Chemother. 2010; 65(4):644–50. doi: 10.1093/jac/dkq027 PMID: 20154023

38. Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef AP, Asensi MD, Peixe L. OXA-23-producing Acinetobacter baumannii: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(1):62–5. doi: 10.1093/jac/dkq406 PMID: 21051372

39. Martins N, Martins IS, de Freitas WV, de Matos JA, Girão VB, Coelho-Souza T, et al. Imported and Intensive Care Unit-Born Acinetobacter baumannii clonal complexes: one-year prospective cohort

study in intensive care patients. Microb Drug Resist. 2013; 19(3):216–23. doi: 10.1089/mdr.2012.0174 PMID: 23336529

40. Ramirez MS, Vilacoba E, Stietz MS, Merkier AK, Jeric P, Limansky AS, et al. Spreading of AbaR-type genomic islands in multidrug resistance Acinetobacter baumannii strains belonging to different clonal complexes. Curr Microbiol. 2013; 67(1):9–14. doi: 10.1007/s00284-013-0326-5 PMID: 23397241

41. Stietz MS, Ramirez MS, Vilacoba E, Merkier AK, Limansky AS, Centrón D, Catalano M. Acinetobacter baumannii extensively drug resistant lineages in Buenos Aires hospitals differ from the international clones I–III. Infect Genet Evol. 2013; 14:294–30. doi: 10.1016/j.meegid.2012.12.020 PMID: 23313831

42. Climaco EC, Oliveira ML, Pitondo-Silva A, Oliveira MG, Medeiros M, Lincopan N, da Costa Darini AL. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii in Southeast Brazil. Infect Genet Evol. 2013; 19:127–33. doi: 10.1016/j.meegid.2013.06.024 PMID: 23838284

43. Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef AP, Asensi MD, Peixe L. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? J Antimicrob Chemother. 2011; 66(1):62–65. doi: 10.1093/jac/dkq406 PMID: 21051372

44. Carvalho KR, Carvalho-Assef AP, Peirano G, Santos LC, Pereira MJ, Asensi MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34(1):25–8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.12.009 PMID: 19216059

45. Tognim MC, Andrade SS, Silbert S, Gales AC, Jones RN, Sader HS. Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Int J Infect Dis. 2004; 8(5):284–291. PMID: 15325597

46. Lu PL, Doumith M, Livermore DM, Chen TP, Woodford N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(4):641–647. doi: 10.1093/jac/dkn553 PMID: 19182237

47. Giamarellos-Bourboulis EJ, Xirouchaki E, Giamarellou H. Interactions of colistin and rifampin on multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Diagn Microbiol Infect Dis. 2001; 40(3):117–120. PMID: 11502379

48. Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA beta-lactamases in Acinetobacter baumannii from Singapore. J Antimicrob Chemother. 2007; 59(4):627–32. PMID: 17284537

49. Kim CK, Lee Y, Lee H, Woo GJ, Song W, Kim MN et al. Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible Acinetobacter isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 68(4):432–8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.014 PMID: 20884158

50. de Sá Cavalcanti FL, Almeida AC, Vilela MA, de Morais Junior MA, de Morais MM, Leal-Balbino TC. Emergence of extensively drug-resistant OXA-72-producing Acinetobacter baumannii in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination? Diagn Microbiol Infect Dis. 2013; 77(3):250–1. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.022 PMID: 24055437

51. Werneck JS, Picão RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. OXA-72-producing Acinetobacter baumannii in Brazil: a case report. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(2):452–4. doi: 10.1093/jac/dkq462 PMID: 21131320

52. de Souza Gusatti C, Bertholdo LM, Otton LM, Marchetti DP, Ferreira AE, Corção G. First occurrence of blaOXA-58 in Acinetobacter baumannii isolated from a clinical sample in Southern Brazil. Braz J Microbiol. 2012; 43(1):243–6. doi: 10.1590/S1517-83822012000100027 PMID: 24031824

53. Biswas S, Mohammad MM, Patel DR, Movileanu L, van den Berg B. Structural insight into OprD substrate specificity. Nat Struct Mol Biol. 2007; 14(11):1108–9. PMID: 17952093

54. Aydemir H, Akduman D, Piskin N, Comert F, Horuz E, Terzi A, et al. Colistin vs colistin and rifampicin combination in the treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia. Epidemiol Inf. 2013; 141(6):1214–1222.

55. Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent Synergism and Sustained Bactericidal Activity of a Vancomycin-Colistin Combination versus Multidrug-Resistant Strains of Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(12):5316–22. doi: 10.1128/AAC.00922-10 PMID: 20876375

56. O'Hara JA, Ambe LA, Casella LG, Townsend BM, Pelletier MR, Ernst RK, et al. Activities of vancomycin-containing regimens against colistin-resistant Acinetobacter baumannii clinical strains. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57(5):2103–8. doi: 10.1128/AAC.02501-12 PMID: 23422916

57. Vidaillac C, Benichou L, Duval RE. In vitro synergy of colistin combinations against colistin-resistant Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, and Klebsiella pneumoniae isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(9):4856–61. doi: 10.1128/AAC.05996-11 PMID: 22751540

58. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Gutiérrez-Pizarraya A, Espejo-Gutiérrez de Tena E, Artero-González ML, Corcia-Palomo Y, Bautista-Paloma J. Clinical Efficacy and Safety of the Combination of Colistin plus Vancomycin for the Treatment of Severe Infections Caused by Colistin-susceptible Acinetobacter baumannii. Chemotherapy. 2013; 59(3):225–31. doi: 10.1159/000356004 PMID: 24356297