Thays Almeida Franco de Barcellos

**Análise genômica e caracterização da suscetibilidade
antimicrobiana em clones emergentes de *Acinetobacter
baumannii* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de
diferentes instituições brasileiras**

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Dr. Carlos Henrique Camargo

**São Paulo
2021**

Thays Almeida Franco de Barcellos

**Análise genômica e caracterização da suscetibilidade
antimicrobiana em clones emergentes de *Acinetobacter
baumannii* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de
diferentes instituições brasileiras**

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Dr. Carlos Henrique Camargo

**São Paulo
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Barcellos, Thays Almeida Franco de
Análise genômica e caracterização da
susceptibilidade antimicrobiana em clones emergentes
de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos
carbapenêmicos provenientes de diferentes
instituições brasileiras / Thays Almeida Franco de
Barcellos. -- São Paulo, 2021.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Carlos Henrique Camargo.

Descritores: 1. *Acinetobacter baumannii* 2. Anti-
infecciosos 3. Resistência microbiana a medicamentos
4. Oxacilinas 5. Infecção hospitalar 6. Epidemiologia
molecular

USP/FM/DBD-136/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo à minha família, em especial, aos meus pais André e Solange.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me iluminado em mais uma jornada. Agradeço por me permitir realizar tantos sonhos, errar, aprender e crescer. Agradeço pela saúde, força e determinação.

Aos meus pais, pelo exemplo. Sinto-me orgulhosa por ser filha de vocês. Obrigada por sempre me apoiarem em tudo nesta vida.

Ao meu companheiro de vida, Patrick, por todo amor, carinho, atenção, força, paciência e prestígio. Sou muito grata por tudo que fez por mim até aqui.

À minha família, avó, tias(os), primos(as), amiga de infância Amanda Fabri, cunhada e aos meus sogros Betânia e José, por compreenderem o quanto isso é importante para mim. Obrigada por terem sempre uma palavra de conforto.

Às minhas amigas Amanda Bertani, Carolina Pedace e Mariana Bueno por esses quase cinco anos juntas. Obrigada por cada crítica, sugestão e apoio, seja na dissertação ou na vida.

Aos colegas e amigos feitos no Laboratório Centro de Genomas, especialmente à Gabriela Albuquerque e Thaís Suzuki, que apesar de terem aparecido na minha vida no final do mestrado, foram de grande importância nessa fase.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Henrique Camargo, pela oportunidade, competência, inteligência, confiança e dedicação. Obrigada por acreditar em mim, não chegaria aqui sem você.

Ao Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, onde realizei toda a parte prática deste trabalho. Agradeço imensamente aos colegas por todo o aprendizado e por ter sido sempre tão bem acolhida. Em especial, agradeço à

Sônia Regina, Ricardo Polatto e Carla Adriana pela ajuda prestada quando precisei.

À banca de avaliadores do exame de qualificação, Dra. Raquel Girardello, Dra. Maristela Pinheiro e Dra. Rosemeire Cobo pelas sugestões, palavras de apoio e por compartilharem conhecimento e experiência.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por conceder a bolsa de estudos.

À FAPESP pelo apoio financeiro (processo 2017/16988-6).

Por fim, à todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

EPÍGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Barcellos TAF. Análise genômica e caracterização da suscetibilidade antimicrobiana em clones emergentes de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de diferentes instituições brasileiras [dissertação]. São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Altamente prevalente nos hospitais, *Acinetobacter baumannii* tem gerado grande apreensão devido sua capacidade de causar Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde em todo o mundo, impactando nas elevadas taxas de morbidade e mortalidade e à sua capacidade de causar surtos e disseminar clones resistentes. As altas taxas de resistência frente aos carbapenêmicos, assim como os aminoglicosídeos, tetraciclinas e quinolonas, juntamente com a falta de novas opções terapêuticas, tem levado à necessidade de recorrer novamente a fármacos antigos, como a polimixina B. O contexto epidemiológico-molecular de *A. baumannii* é complexo, as cepas pertencentes aos Complexos Clonais CC1, CC15 e CC79, denominadas clones de alto risco, são as mais relatadas no Brasil, porém a ocorrência de outros clones alerta para a necessidade de constante monitoramento, como é o caso do CC25, que recorrentemente é encontrado em nosso país. O objetivo deste estudo foi realizar a análise genômica e caracterizar a susceptibilidade aos antimicrobianos em clones emergentes de 13 isolados de *A. baumannii* provenientes de diferentes hospitais brasileiros entre os anos de 2016 e 2017, porém com o intuito de selecionar isolados representantes de pulsotipos diferentes e aumentar o número de amostras a serem estudadas, foram acrescentados três isolados de 2013 e dois de 2018, resultando em 18 isolados neste estudo. Os isolados foram submetidos às técnicas de PCR multiplex para detecção das oxacilinases, teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE), tipagem por 3 loci modificado (m3LST), sequenciamento de genoma completo e perfil de análise populacional (PAP) para polimixina B. Detectou-se principalmente os genes *bla*_{OXA-64} em 13 isolados (72,2%), *bla*_{OXA-23} em 16 isolados (88,9%), *bla*_{OXA-72} em dois (11,1%) e *bla*_{OXA-253} em apenas um (5,6%). Houve dois isolados (11,1%) que foram carreadores de *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-72} simultaneamente. Todos os isolados, (n=17; 94,5%) foram classificados como XDR, com exceção de um (n=1; 5,5%) que foi considerado MDR. A minociclina foi o único antibiótico que se manteve 100% eficaz contra todas as cepas. Através da técnica de PFGE e m3LST conseguimos, presuntivamente, agrupar os isolados de acordo com suas diversidades genéticas e similaridades clonais. Através do sequenciamento de genoma completo, obtivemos quinze isolados identificados como pertencentes ao CC25 e três isolados pertencentes aos CC49, CC33 e CC162. Oito cepas (44,4%) apresentaram resistência frente à polimixina B, sendo seis delas pertencentes ao CC25. Estes resultados fornecem subsídios que ressaltam a necessidade de monitoramento e controle de clones emergentes circulando em nosso meio.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*, infecção hospitalar, complexo clonal, antimicrobianos, epidemiologia molecular, oxacilinases, resistência.

ABSTRACT

Barcellos TAF. Genomic analysis and characterization of antimicrobial susceptibility in emerging clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from different Brazilian institutions [dissertation]. São Paulo, School of Medicine, University of São Paulo; 2021.

Highly prevalent in hospitals, *Acinetobacter baumannii* has raised great concern due to its ability to cause Healthcare-associated Infections worldwide, to cause epidemiological outbreaks and to spread resistant clones, impacting morbidity and mortality rates. The high rates of carbapenems resistance, as well as aminoglycosides, tetracyclines and quinolones, coupled with the lack of new therapeutic approaches, has led the need to revisit old drugs, such as polymyxin B. The epidemiological-molecular context of *A. baumannii* is complex. The strains belonging to the Clonal Complexes CC1, CC15 and CC79, known as high-risk clones, are the most frequent in Brazil, however the occurrence of other clones highlight the importance for constant monitoring, as is the case of CC25, which is recurrently reported in our country. The aim of this study was to perform a genomic analysis and characterize antimicrobial susceptibility in emerging clones from 13 *A. baumannii* isolates from different Brazilian hospitals in the years 2016 and 2017. In order to select isolates representing different pulsotypes and increase the number of samples, three isolates from 2013 and two from 2018 were also investigated, resulting in 18 isolates in this study. The isolates were submitted to multiplex PCR techniques for the detection of oxacillinases, antimicrobial susceptibility testing, molecular typing by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), modified PCR-based trilocus sequence-based typing (m3LST), complete genome sequencing and Population Analysis Profile (PAP) for polymyxin B. The *bla*_{OXA-64} genes were mainly detected in 13 isolates (72.2%), *bla*_{OXA-23} in 16 isolates (88.9%), *bla*_{OXA-72} in two (11.1%) and *bla*_{OXA-253} in only one (5.6%). There were two isolates (11.1%) that were carriers of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-72} simultaneously. All isolates (n=17; 94.5%) were classified as XDR (extensively resistant drug), except for one (n=1; 5.5%) that was considered MDR (multi-drug resistant). Minocycline was the only antibiotic that remained 100% effective against all strains. By PFGE and m3LST, we presumably group the isolates according to their genetic diversity and clonal similarities. By complete genome sequencing we obtained fifteen isolates, which were identified as belonging to CC25 and three isolates belonging to CC49, CC33 and CC162. Eight strains (44.4%) showed resistance to polymyxin B, six of which belong to CC25. These results provide subsidies that highlight the importance of monitoring and control of circulating emerging clones in our environment.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, nosocomial infection, clonal complex, antimicrobials, molecular epidemiology, oxacillinases, resistance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3LST	Trilocus Sequence Typing
ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (análise de restrição de DNA ribossomal amplificado)
<i>bla</i>	Gene codificador de beta-lactamase
CC	Complexo Clonal
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRab	<i>Acinetobacter baumannii</i> Resistente aos Carbapenêmicos
<i>csuE</i>	Gene associado a formação de biofilme
CVC	Cateter Venoso Central
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
ICS	Infecções de Corrente Sanguínea
IPCS	Infecção Primária da Corrente Sanguínea
IPCSL	Infecção Primária da Corrente Sanguínea Laboratorial
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IS	Sequência de inserção
Kb	Quilobase
LPS	Lipopolissacarídeo
m3LST	Trilocus Sequence Typing modificado

Maldi-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry
Mb	Megabase
MDR	Multidrug-resistant (multirresistente)
MIC	Minimum inhibitory concentration (concentração inibitória mínima)
MLST	Multilocus Sequence Typing
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase
PBP	Penicillin-Binding Protein (proteína ligadora de penicilina)
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PDR	Pandrug-resistant (pan resistente)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (eletroforese em campo pulsado)
PNPCIRAS	Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ST	Sequence Type
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
XDR	Extensively Drug-Resistant (extensivamente resistente)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Principais resistências desenvolvidas pelas bactérias aos antibióticos.....	23
Figura 2.	Mecanismos de modificação do LPS envolvidos na resistência à polimixina em <i>A. baumannii</i>	28
Figura 3.	Estrutura química dos diferentes grupos de beta-lactâmicos	29
Figura 4.	Epidemiologia global de <i>Acinetobacter</i> spp. resistentes aos carbapenêmicos.....	31
Figura 5.	Esquema representativo da organização das placas de microdiluição em caldo.....	52
Figura 6.	Determinação do método de microdiluição em caldo (BMD).....	63
Figura 7.	Dendrograma gerado a partir do perfil de restrição (ApaI) e eletroforese em campo pulsado de cepas de <i>A. baumannii</i> representativas dos clones emergentes, determinado por 3-loci sequence typing (m3LST).....	64
Figura 8.	Dendrograma correlacionando as mutações observadas pelo MALDI-TOF (em preto) e os complexos clonais no sequenciamento. Verde: CC15, vermelho: CC25, azul: CC1 e rosa: CC79.....	65
Figura 9.	Dendrograma gerado baseando-se nos picos de MALDI-TOF. Cada cor representa um grupo diferenciado de cepas de <i>A. baumannii</i>	66
Figura 10	Análise por eBURST demonstrando as subdivisões de grupos de STs do CC25.....	68
Figura 11	Análise por eBURST demonstrando as subdivisões de grupos de STs pertencentes aos complexos clonais CC33, CC49 e CC162.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Grupos de antimicrobianos utilizados contra <i>A. baumannii</i> e seus respectivos mecanismos de ação e resistência.....	24
Quadro 2.	Esquema de classificação das oxacilinases descritas em <i>A. baumannii</i> até o momento.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequência de primers e tamanhos dos amplicons utilizados para detecção dos genes de oxacilinases em <i>A. baumannii</i>	47
Tabela 2.	Sequência dos primers utilizados para a identificação dos genes dos complexos clonais em <i>Acinetobacter</i>	51
Tabela 3.	Interpretação dos resultados da detecção dos complexos clonais em <i>Acinetobacter</i>	51
Tabela 4.	Informações gerais referentes aos 18 isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos pertencentes aos clones emergentes estudados.....	60
Tabela 5.	Distribuição dos genes das oxacilinases encontrados entre os isolados (n=18).....	61
Tabela 6.	Determinação da CIM ₅₀ e CIM ₉₀ de cada fármaco testado através da microdiluição em caldo e seus respectivos percentuais de suscetibilidade em isolados de <i>A. baumannii</i> resistentes aos carbapenêmicos pertencentes aos clones emergentes estudados (n=18).....	62
Tabela 7.	Distribuição dos alelos do gene <i>bla</i> OXA-51-like em comparação às sequências tipo (Esquema do Instituto Pasteur) nos 18 isolados de <i>A. baumannii</i>	67
Tabela 8.	Distribuição dos alelos dos genes <i>bla</i> OXA-23-like, <i>bla</i> OXA-24/40-like e <i>bla</i> OXA-143-like em comparação às sequências tipo (Esquema do Instituto Pasteur) nos 18 isolados de <i>A. baumannii</i>	67
Tabela 9.	Resultado da tipagem por sequenciamento de multilocus, para os 7 genes constitutivos segundo o protocolo do Instituto Pasteur para o isolado IAL 545 que apresentou novo alelo <i>rplB</i> -114.....	68
Tabela 10.	Taxas de resistência aos antimicrobianos entre cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> pertencentes ao complexo clonal CC25 e aos outros CC (n=18).....	69
Tabela 11.	Distribuição dos fenótipos de resistência de <i>A. baumannii</i> de acordo com o Complexo Clonal e aos outros CC (n=18).....	70
Tabela 12.	Distribuição dos genes de resistência antimicrobiana em cepas de <i>A. baumannii</i> pertencentes ao complexo clonal CC25 e aos outros CC (n=18).....	70
Tabela 13.	Distribuição das bombas de efluxo encontradas em cepas de <i>A. baumannii</i> pertencentes ao complexo clonal CC25 e aos outros CC (n=18).....	71

Tabela 14. Mutações em proteínas constitutivas associadas com fenótipos de resistência a polimixina B em <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	72
---	----

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	42
2.1 Objetivo geral.....	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 Seleção de amostras.....	45
3.2 PCR multiplex para confirmação de <i>A. baumannii</i> e detecção das oxacilinases.....	45
3.3 Determinação da diversidade genética por PFGE.....	47
3.3.1 Preparo das amostras.....	47
3.3.2 Digestão das amostras com enzimas de restrição.....	48
3.3.3 Preparo do gel e eletroforese.....	48
3.3.4 Análise de dados.....	49
3.4 Identificação presuntiva dos complexos clonais por m3LST.....	50
3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	52
3.6 Perfil de Análise Populacional (PAP).....	54
3.7 Extração de proteínas para o MALDI-TOF MS.....	55
3.8 Caracterização e clonalidade por MALDI TOF-MS.....	56
3.9 Extração do DNA bacteriano para sequenciamento.....	56
3.10 Sequenciamento de Genoma Completo.....	58
4. RESULTADOS.....	59
4.1 Detecção das oxacilinases.....	60
4.2 Identificação preditiva dos complexos clonais por m3LST.....	61
4.3 Teste de suscetibilidade por concentração inibitória mínima (CIM)...	61
4.4 Perfil de Análise Populacional (PAP).....	63

4.5 Tipagem molecular por PFGE.....	64
4.6 MALDI TOF-MS.....	64
4.7 Sequenciamento de Genoma Completo (WGS).....	66
5. DISCUSSÃO.....	74
6. CONCLUSÕES.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
8. ANEXOS.....	110
8.1 Preparo de soluções.....	111
8.2 Artigos publicados no período de pós-graduação.....	115

1 INTRODUÇÃO

Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) constituem um grave problema mundial de saúde pública, impactando negativamente nas taxas de morbidade, mortalidade, tempo de internação e custos associados aos cuidados ao paciente (Maragakis e Perl, 2008; Gulen et al., 2015). Desde 1990, o termo “infecções hospitalares” foi substituído por “infecções relacionadas à assistência à saúde”, devido uma ampliação conceitual do termo (Horan et al., 2008). Por definição, segundo o *National Healthcare Safety Network* (NHSN), as IRAS compreendem qualquer infecção adquirida após a admissão do paciente em ambiente hospitalar e que se manifeste durante a internação ou após a alta, desde que esteja correlacionada com procedimentos hospitalares realizados (ANVISA, 2017).

Destaca-se que a magnitude das IRAS é muito maior em países em desenvolvimento, quando comparadas às de países desenvolvidos, podendo apresentar taxas 20 vezes maiores. Sendo um fato, visto que países desenvolvidos possuem maior estrutura para o desenvolvimento de programas de âmbito governamental para a eliminação destas (Padoveze, 2019).

As IRAS são causa de grande preocupação das instituições de saúde do Brasil, sendo cada vez mais prevalentes (Rocha et al., 2010). De acordo com projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS), 10 milhões de mortes anuais serão atribuídas às infecções por patógenos com resistência aos antimicrobianos no ano de 2050, caso não forem encontradas soluções proativas para retardar este aumento (OMS, 2015).

Em 2013, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) instituiu o Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS), com o objetivo de diminuir, em âmbito nacional, a incidência de IRAS, reduzindo as Infecções Primárias de Corrente Sanguínea (IPCS) e as infecções do sítio cirúrgico e estabelecer mecanismos de controle sobre a resistência bacteriana aos antimicrobianos em serviços de saúde (Anvisa, 2013; Chagas, 2015).

Em 2017, a OMS publicou uma lista de “patógenos prioritários” resistentes aos antibióticos. Esta lista foi dividida em três categorias de acordo com a urgência em que se necessitam novos antibióticos, sendo o grupo mais crítico àquele considerado perigoso em hospitais e entre os pacientes cujos cuidados

exigem dispositivos como ventiladores e cateteres intravenosos, tendo como destaque *Acinetobacter* spp. (OMS, 2017).

Entre os patógenos mais frequentemente identificados em IRAS, destacam-se espécies do gênero *Acinetobacter* spp., que são causadoras de uma das maiores taxas de letalidade entre pacientes adultos hospitalizados em UTI no Brasil (Marra et al., 2011; ANVISA 2014a, 2014b).

Diversos casos de osteomielite e infecção de sítio cirúrgico foram relatados em soldados repatriados da guerra do Iraque (Davis et al., 2005; Turton et al., 2006). Entre 2006 e 2008, durante a guerra no Iraque e Afeganistão, houve um aumento dramático de infecções por *A. baumannii* em soldados feridos envolvendo transferência inter e intra-hospitalar, onde geralmente, essas infecções eram resistentes a vários antibióticos, incluindo os carbapenêmicos. Um estudo subsequente descobriu que isolados recuperados de soldados feridos estavam geneticamente relacionados com aqueles recuperados em superfícies de hospitais de campo, ao invés de colonização ou introdução no momento da lesão e, com isso, sugeriu-se que o retorno de soldados das zonas de combate fosse um fator importante que contribuiu para a epidemiologia das infecções por *A. baumannii* nos Estados Unidos (Hamidian e Nigro, 2019).

Infecções causadas por *Acinetobacter* spp. aumentam em 50% o risco de morte de pacientes graves com bacteremias, internados em UTIs, comparado a pacientes em situação semelhante, porém com bacteremias causadas por outros patógenos (Leão et al., 2016).

O gênero *Acinetobacter* spp. apresenta espécies com morfologia em forma de bacilos durante a fase de crescimento exponencial e de cocobacilos na fase estacionária. São bactérias Gram-negativas, imóveis, não-fermentadoras de glicose, aeróbias, encapsuladas, catalase-positivas, oxidase-negativas e apresentam DNA com porcentagem de citosina e guanina que varia entre 39% e 47% (Konemann et al., 2006; Perez et al., 2007; Murray, 2007; Peleg et al., 2008).

São bactérias com alta capacidade de adaptação em diversos ambientes e possuem habilidade de crescer em diferentes condições de temperatura e pH, tolerância a baixas taxas de umidade e capacidade de formar biofilmes (Juni, 1978; Jawad et al., 1998; Wisplinghoff et al., 2007; Peleg et al., 2008; Chagas,

2015). *Acinetobacter* spp. pode estar presente em locais úmidos (como umidificadores e torneiras), equipamentos de ventilação, leitos de hospitais, entre outros (Manikal et al., 2000; Bernards et al., 2004; Dijkshoorn et al., 2007). Além disso, está relacionado com infecções do trato urinário, meningites secundárias, infecções da corrente sanguínea, dispositivos invasivos e pneumonias (Higgins et al., 2010; Peleg, Seifert e Paterson, 2008).

São bactérias pertencentes à família Moraxellaceae, da ordem Gammaproteobacteria e compreendem 63 espécies validadas e 6 *genospecies* que ainda não receberam identificação definitiva (bacterio.net/acinetobacter.html; apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf).

Este gênero foi inicialmente isolado do solo e descrito por Beijerinck, em 1911, sob a denominação de *Micrococcus calcoaceticus*. Apesar de Brisou e Prévot, em 1954, terem proposto o termo *Acinetobacter* para o gênero, foi somente em 1968 com o estudo de Baumann e colaboradores que o gênero passou a ser denominado *Acinetobacter* (Lessel, 1971). Em 1986, Bouvet e Grimont descreveram 12 *genoespécies* de *Acinetobacter* spp. pela técnica de hibridização DNA-DNA, incluindo *Acinetobacter baumannii*. Com o avanço dos métodos de identificação moleculares, os quais permitem maior discriminação entre os microrganismos similares, as nomenclaturas das diversas espécies tiveram mudanças consideráveis (Urban et al., 2003).

A identificação entre as espécies de *Acinetobacter* é bastante complexa, visto que há grande similaridade genética entre elas. Para referenciar essas espécies, foi proposto agrupá-las em um complexo chamado *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Gener-Smidt, 1991; Bouvet et al, 1987). Inicialmente, esse complexo era formado por quatro *genospecies*, 1, 2, 3 e 13TU, atualmente identificadas como: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis*, respectivamente (Beijerinck, 1911; Bouvet et al., 1987; Nemec et al., 2011). Nos últimos anos, as espécies *Acinetobacter seifertii* e *Acinetobacter dijkshoorniae* foram adicionadas ao complexo (Barbosa, 2019).

As bactérias do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, assim como outras bactérias gram-negativas, como *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, na maioria das vezes, são as que apresentam alto

nível de resistência a quase todos os antimicrobianos disponíveis, incluindo as penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, carbapenêmicos e polimixinas (Mota et al., 2018) gerando consequências graves pela falta de opção terapêutica.

A resistência bacteriana é um problema de saúde pública emergencial em todo o mundo, compreendendo uma ameaça recorrente (Rossi et al., 2011). A associação entre o uso de antimicrobianos e o desenvolvimento de resistência bacteriana é conhecida desde a introdução da penicilina, tendo sido, a partir de então, sistematicamente confirmada após o lançamento de diversos representantes de cada uma das diferentes classes farmacológicas (Gotterman et al., 2009).

Há fatores que favorecem à bactéria expressar resistência aos antimicrobianos, como a habilidade em adquirir plasmídeos carregando genes de resistência aos fármacos, baixa permeabilidade da membrana externa, perda de porinas, alterações nos sítios de ligação dos antibióticos, hiperexpressão dos sistemas de efluxo e a produção de enzimas que alteram o fármaco, causando vantagens adaptativas para a sobrevivência em meios com antimicrobianos (Bonomo e Szabo, 2006) (Figura 2).

Figura 1. Principais resistências desenvolvidas pelas bactérias aos antibióticos.
Fonte: Bonomo e Szabo, 2006.

A capacidade de *A. baumannii* em sobreviver a condições subótimas, faz com que ele se adapte facilmente ao ambiente hospitalar e, dessa forma, adquira vários mecanismos de resistência e expresse fenótipos de multirresistência (MDR), que seria a resistência a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas; resistência extensiva (XDR), onde há resistência a todas, com exceção de duas ou menos categorias antimicrobianas; e mesmo cepas com pan-resistência (PDR), possuindo resistência a todos os agentes em todas as classes antimicrobianas (Magiorakos et al., 2012). Por esta razão, o problema primordial em relação ao *Acinetobacter* é a resistência aos antimicrobianos, os quais inclui a resistência intrínseca às aminopenicilinas, às cefalosporinas de primeira e segunda geração, ao cloranfenicol e ao ertapenem (CLSI, 2021). Historicamente, os antimicrobianos carbapenêmicos eram considerados fármacos de escolha para tratamento de infecções graves por *A. baumannii* (Karageorgopoulos e Falagas 2008). Entretanto, a resistência a esta e outras classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos, tetraciclina, quinolonas) é cada vez mais comum, levando a necessidade de utilizar lipopeptídeos, como a polimixina B, que passou a ser novamente indicada para o tratamento, apesar da sua alta incidência de nefrotoxicidade (Kempf e Rolain, 2012); porém há estudos que já relatam cepas resistentes frente à esse fármaco, causando preocupação devido a falta de outras opções terapêuticas (Gomes et al., 2018).

Dentre as opções terapêuticas disponíveis com atividade contra *A. baumannii* estão: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, fluorquinolonas, sulfonamida, aminoglicosídeos, tetraciclina e lipopeptídeos. No Quadro 1, estão listados os grupos de antibióticos utilizados contra *A. baumannii* e alguns de seus mecanismos de ação e resistência.

Quadro 1. Grupos de antimicrobianos utilizados contra *A. baumannii* e seus respectivos mecanismos de ação e resistência

Classe	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência
Aminoglicosídeos (amicacina, tobramicina,	Inibição da síntese protéica, ligadora à subunidade ribossomal	Modificação do alvo ribossomal e modificação enzimática por 16S rRNA

gentamicina, netilmicina)	30S (Oliveira, Cipullo e Burdmann, 2006)	metilase (Vakulenko e Mobashery, 2003)
Carbapenêmicos (imipenem, meropenem, doripenem)	Inibição da síntese da parede celular, fixando- se às proteínas fixadoras de penicilinas, impedindo a produção de peptideoglicano (Martins e Barth, 2013)	Redução da permeabilidade da membrana externa ocasionada pela perda de porinas, alterações nos sítios de ligação das drogas, entre outros (Martins e Barth, 2013)
Fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina)	Inibição da síntese de DNA, ligando-se às enzimas topoisomerases II e IV (Bonomo e Szabo, 2006)	Mutação das enzimas alvo (topoisomerases II e IV) e mutação nos genes reguladores do sistema de efluxo (Bonomo e Szabo, 2006)
Penicilinas + inibidores de beta- lactamases (piperacilina- tazobactam, ticarcilina-ácido clavulânico, ampicilina-sulbactam)	Inibição da síntese da parede celular, fixando- se às proteínas fixadoras de penicilinas, impedindo a produção de peptideoglicano (Martins e Barth, 2013)	Alteração nas PBPs-alvo (Rossi, 2011)
Cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime)	Inibição da síntese da parede celular, fixando- se às proteínas fixadoras de penicilinas, impedindo a produção de peptideoglicano (Martins e Barth, 2013)	Produção de beta- lactamases de espectro estendido (ESBLs) e expressão de bombas de efluxo (Martins e Barth, 2013)
Inibidor da síntese do folato (sulfametoxazol- trimetoprim)	Inibição da síntese do ácido fólico (Baptista, 2013)	Perda da permeabilidade celular, modificação da enzima diidrofolato redutase (Baptista, 2013)
Polimixinas (polimixina B, colistina)	Rompimento da membrana celular (Vila et al., 2007)	Alterações na composição do LPS (Vila et al., 2007)
Tetraciclinas (doxiciclina,	Inibição da síntese protéica, fixando-se à subunidade 30S do	

minociclina, tetraciclina)	ribossomo, impedindo a ligação de aminoacil- t-RNA (Vila et al., 2007)	Sistemas de efluxo e alterações de porinas (Baptista, 2013)
-------------------------------	--	---

Os fármacos pertencentes às classes dos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina são considerados de amplo espectro, pois podem ter ação tanto contra bactérias gram-negativas como para gram-positivas. O que difere uma classe da outra são seus respectivos mecanismos de ação e resistência.

O mecanismo de ação da classe dos aminoglicosídeos ocorre através da diminuição da síntese proteica, fixando-se à subunidade ribossomal 30S, causando leitura incorreta do RNA mensageiro (Oliveira, Cipullo e Burdmann, 2006) e sua resistência pode ser mediada por perda da permeabilidade da membrana celular, modificação do alvo, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) ou expressão dos sistemas de efluxo (Azucena e Mabaskery, 2001; Perez et al., 2007; Sheikhalizadeh et al., 2017).

Com relação a resistência às fluoroquinolonas, seu mecanismo de ação ocorre através de interferência na síntese de DNA, ocasionando morte celular; e sua resistência é devido à substituições de aminoácidos, causadas devido a mutações na DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e topoisomerase IV (*parC* e *parE*), alterando o sítio de ligação do fármaco (Bonomo e Szabo, 2006; Aldred et al., 2014; Hooper e Jacoby, 2016).

Também considerados antimicrobianos de amplo espectro, o mecanismo de ação das tetraciclina ocorre na subunidade 30S do ribossomo, impedindo a ligação de aminoacil-t-RNA, fazendo com que não haja a síntese proteica. Sua resistência ocorre através das bombas de efluxo, que, em *A. baumannii*, Tet(A) e Tet(B) são as principais envolvidas (Vila et al., 2007; Baptista, 2013; Wang et al., 2017).

Quando trata-se das polimixinas, por serem fármacos que agem na membrana citoplasmática, há o comprometimento das propriedades osmóticas e dos mecanismos de transporte da membrana celular. A membrana citoplasmática é uma estrutura presente tanto na célula bacteriana como na célula humana (Hermesen et al., 2003; Arnold et al., 2007; Kwa et al., 2008; Dezoti et al., 2009), consequentemente este fármaco apresenta alta toxicidade e seu

uso passou a ser descontinuado na década de 70 e 80, retornando na década de 90 como principal opção terapêutica.

O mecanismo de resistência às polimixinas é multifatorial complexo. Dessa forma, a utilização do antimicrobiano em doses não suficientes para erradicação do patógeno pode contribuir para o surgimento do fenótipo adaptativo de resistência às polimixinas (Girardello, 2012).

Estudos em *A. baumannii*, mostraram que a modificação no LPS bacteriano é devido à adição de fosfoetanolamina a um grupo fosfato no lipídio A (Arroyo et al., 2011; Miller et al., 2011).

A regulação gênica do desenvolvimento de resistência às polimixinas, por meio de alterações no LPS conhecida até o momento, é realizada pelos sistemas de dois componentes (Girardello, 2012). O sistema PmrA-PmrB é responsável pela regulação da expressão da maioria dos genes envolvidos na modificação do LPS em *A. baumannii*. O sensor de membrana interna histidina quinase PmrB é ativado sob condições de crescimento bacteriano em baixas concentrações de magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}) e em altas concentrações de ferro (Fe^{3+}). A presença de compostos catiônicos, incluindo as polimixinas, no meio também desencadeiam a ativação desses sistemas (Groisman et al., 1997, Moskowitz et al., 2012; Ezadi et al., 2018). Quando a enzima sensora de histidina quinase, PmrB, é ativada, ela fosforila o regulador da resposta citoplasmática, PmrA, que por sua vez modula a expressão de genes alvos, *pmrCAB*, responsável pela modificação de LPS por 4-amino-arabinose e fosfoetanolaminas, respectivamente (Ezadi et al., 2018), conforme figura 3.

O principal mecanismo de resistência à polimixina em *A. baumannii* corresponde à adição de grupos catiônicos ao LPS (modificação qualitativa do LPS); no entanto, a resistência adquirida à polimixina também pode ser a consequência de uma perda completa da produção de LPS (modificação quantitativa do LPS). A adição de grupos catiônicos em *A. baumannii* é mediada por mutações no *pmrAB*. Foi demonstrado que mutações nos genes *pmrA* e *pmrB* causam resistência à colistina através da regulação positiva do operon *pmrCAB*, levando à síntese de pEtN, mas não à síntese de L-Ara4N (ao contrário de enterobacterales) (Poirel et al., 2017).

O segundo mecanismo de resistência à colistina em *A. baumannii* corresponde à perda completa de LPS causada por alterações dos genes da biossíntese de lipídios A, os genes *lpxA*, *lpxC* e *lpxD* (Moffat et al., 2011).

Fonte: modificado de Ezadi et al., 2018.

Figura 2. Mecanismos de modificação do LPS envolvidos na resistência à polimixina em *A. baumannii*. A detecção de várias condições de estresse, como a presença de compostos catiônicos (polimixinas), pH ácido e altas concentrações de Fe^{3+} pela histidina quinase *pmrB*, ativa o sistema de dois componentes PmrA-PmrB. A ativação subsequente do operon *pmrCAB* leva à síntese e adição de fosfoetanolamina (PEtN) ao lipídeo A, ocasionando modificação no LPS bacteriano e posterior resistência à polimixina.

Por último, temos os compostos beta-lactâmicos, os mais utilizados no tratamento das infecções bacterianas devido sua baixa toxicidade e alta eficácia terapêutica e compreendem o maior grupo de fármacos antimicrobianos, que têm como mecanismo de ação a inibição da síntese da parede celular, fixando-se às proteínas fixadoras de penicilinas, impedindo a produção de peptideoglicano (Martins e Barth, 2013) e que se definem pela presença do anel

beta-lactâmico (Tidwell, 2007; Drawz e Bonomo, 2010). Este é constituído por três átomos de carbono e um de nitrogênio.

Há quatro subclasses de beta-lactâmicos disponíveis: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, que são diferenciadas por alterações na sua estrutura química nas cadeias lineares, ocasionando diferentes características, espectros de ação e resistências (Azevedo, 2014).

No caso das penicilinas, o anel beta-lactâmico está fundido ao anel tiazolidina; nas cefalosporinas, ao anel dihidrotiazina; e no caso dos carbapenêmicos, ao anel pirrólico. Em relação aos monobactâmicos, não há nenhum anel fundido ao anel principal (Azevedo, 2014) (Figura 4).

Figura 3. Estrutura química das classes de beta-lactâmicos. Fonte: Adaptado de Suárez e Gudiol, 2009.

O anel beta-lactâmico, além de determinar o mecanismo de ação, que ocorre através da inibição da síntese do peptidoglicano, e possuir uma baixa toxicidade direta, visto que atua na parede celular, também determina o principal mecanismo de resistência por parte das bactérias, as beta-lactamases (Suárez e Gudiol, 2009).

Em 1980, Ambler propôs classificar as beta-lactamases com base em sua sequência de aminoácidos em quatro classes moleculares principais: A) serino β -lactamases, incluindo as β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs),

penicilinas e carbenicilinas; B) metalo- β -lactamases; C) cefalosporinas cromossomais; e D) oxacilinas (Ambler, 1980). Bush, em 1989, propôs uma classificação na qual correlacionava o substrato preferencial e propriedades inibitórias à estrutura molecular da enzima (Bush, 1989a; Bush, 1989b). Em 2010, Bush, Jacoby e Medeiros propuseram uma atualização da classificação inicial de Bush que combinava características estruturais e funcionais das β -lactamases e, em 2020, houve outra atualização feita por Bush e Bradford (Quadro 2).

Quadro 2. Esquema de classificação das oxacilinas descritas em *A. baumannii* até o momento.

Classificação Bush, Jacoby e Medeiros (2010)	Classificação de Ambler (1980)	Substrato	Representantes
Grupo e subgrupo funcional	Classe Molecular		
2d	D	Oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Oxacilina e cefalosporinas de espectro estendido	OXA-11, OXA-15
2df	D	Oxacilina e carbapenêmicos	OXA-23, OXA-48, OXA-253, OXA-72, OXA-231, etc

Fonte: Adaptado de Ambler (1980), Bush, Jacoby e Medeiros (2010) e Bush e Bradford (2020).

O significativo aumento da resistência em *A. baumannii* aos carbapenêmicos é descrito em diferentes lugares do mundo (Gales et al., 2011; Su et al., 2012; Prado et al., 2014; Kim et al., 2014b; Nordmann e Poirel, 2019) (Figura 5).

Figura 4. Epidemiologia global de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos. Fonte: Adaptado de Kim et al., 2014b; Nordmann e Poirel, 2019.

As oxacilinases são as enzimas mais prevalentes em CRAB (*A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos) e são classificadas na classe D de Ambler (Livermore, 2002).

Apesar de serem antibióticos de amplo espectro, em *A. baumannii* a expressão de beta-lactamases que hidrolisam carbapenêmicos são clinicamente importantes devido ao fato de carregarem muitos mecanismos de resistência, sobretudo as oxacilinases (Sader et al., 2001; Moreira, 2004; Kiffer et al., 2005a). O primeiro relato de surto causado por CRAB no Brasil ocorreu em 2003 em Curitiba. Nesse estudo, foram avaliados 11 isolados provenientes de dois hospitais diferentes no ano de 1999. Todos os pacientes haviam sido submetidos a ventilação mecânica e, apesar do uso de diferentes terapias antimicrobianas, cinco foram a óbito. A presença de β -lactamases tipo metalo- β -lactamases e oxacilinases foi pesquisada, e oito isolados foram positivos para o gene *bla_{oxA-23}*. Através de métodos de tipagem, os autores confirmaram que o surto foi

monoclonal e houve disseminação entre os hospitais (Dalla-Costa et al., 2003). Em diferentes regiões do Brasil já foram descritos surtos semelhantes, como no Rio de Janeiro e em Porto Alegre (Carvalho et al., 2009).

Na cidade de Porto Alegre, o primeiro caso de CRAb ocorreu em 2004 em um hospital universitário. Em 2007 houve um surto de grandes proporções envolvendo distintos hospitais, que culminou com o fechamento de pelo menos três UTIs, como no caso de um estudo realizado por Pagano e colaboradores (2018) (Dalla-Costa et al., 2003; Van Dessel et al., 2004; Van Den Broek et al., 2006; Valenzuela et al., 2007; Zarrilli et al., 2007; Enoch et al., 2008; Carvalho et al., 2009; Martins et al., 2009, Pagano et al., 2018).

As oxacilinases são as enzimas mais importantes que hidrolisam os betalactâmicos para as espécies de *Acinetobacter*. Há cinco subgrupos principais de oxacilinases associadas à resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii*: OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-51-like, OXA-58-like, OXA-143-like e OXA-253-like.

Oxacilinases do tipo OXA-51-like são intrínsecas de *A. baumannii* (designado de OXA-Ab por simplicidade) e encontradas naturalmente no cromossomo da espécie (Brown, 2005; Turton et al., 2006; Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Pfeifer, 2011; Hamidian e Nigro, 2019). Esta enzima foi identificada em 2005, em isolados de 1996 provenientes da Argentina (Brown, 2005; Pfeifer, 2011). O grande número de variantes existentes nesse grupo (mais de 180) pode ser um indicativo de que esta enzima esteja sendo submetida à pressão seletiva de antimicrobianos, o que as relacionaria à resistência em *A. baumannii* (Evans e Amyes, 2014; Hamidian e Nigro, 2019).

No que diz respeito à resistência antimicrobiana, as enzimas do grupo OXA-23-like são mais importantes que as enzimas OXA-51-like, por serem adquiríveis e transferíveis, altamente prevalentes no mundo todo e encontradas em todos os continentes (Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Mugnier et al., 2010; Nigro e Hall, 2015; Poirel e Nordmann, 2015). A OXA-23 foi descrita em 1993 em Edimburgo, sendo a primeira oxacilinase a conferir resistência a imipenem identificada em *A. baumannii* no mundo (Paton et al., 1993). O fato de diversos genes codificadores de OXA-23 terem sido encontrados no cromossomo de isolados de *Acinetobacter radioresistens* indica que essa espécie é provável

fonte natural desse grupo enzimático, tendo possivelmente transferido esses genes para *A. baumannii* horizontalmente (Poirel et al., 2008; Mendes et al., 2009; Nigro e Hall, 2016).

No Brasil, isolado produtor de OXA-23 foi descrito pela primeira vez em Curitiba, em 2003, e estendeu-se posteriormente a outros estados como São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Distrito Federal, Espírito Santo e Minas Gerais, entre outros (Medeiros e Lincopan, 2013). Atualmente, a OXA-23 é a principal responsável pela resistência à carbapenêmicos em *A. baumannii* no Brasil. No entanto, estudos mostram que a OXA-72 tem emergido nos últimos anos (Vasconcelos, 2015).

As enzimas do grupo OXA-24/40-like são menos frequentes em nosso país. A enzima OXA-24 foi identificada equivocadamente em 1997 em isolados de um surto de *A. baumannii* na Espanha. Porém, essa mesma oxacilinase classificada como OXA-40 já foi detectada em plasmídeos de outras espécies de *Acinetobacter* e de enterobactérias (Evans e Amyes, 2014). No Brasil, uma variante do grupo OXA-24/40-like foi primeiramente detectada em um isolado de *A. baumannii* de 2007 em São Paulo, identificada como OXA-72 (Werneck et al., 2011a).

A primeira cepa de *A. baumannii* carreadora de OXA-58 foi isolada na França em 2003 (Poirel et al., 2005; Peleg, Seifert e Paterson, 2008; Sevillano et al., 2012; Wu et al., 2015). No Brasil, a OXA-58 foi pontualmente detectada em 2010 em isolados de São Paulo, e em 2011 na cidade do Rio de Janeiro, sendo relatada esporadicamente (Antonio et al., 2011; Figueiredo et al., 2011; Medeiros e Lincopan, 2013).

A primeira representante do grupo OXA-143-like foi descrita no Brasil em 2004 na região metropolitana de São Paulo (Higgins et al., 2009; Mostachio et al., 2012). Especificamente no Brasil, variantes dessa enzima foram detectadas como OXA-231 no Paraná, na cidade de São Paulo (Gionco et al., 2012; Camargo et al., 2016), Minas Gerais (Medeiros e Lincopan, 2013) e Rio de Janeiro (Werneck et al., 2011b) e OXA-253 em Belo Horizonte (Girlich et al., 2014) e Recife (de Sá Cavalcanti et al., 2016). Sendo assim, tido como o segundo gene mais frequentemente identificado em isolados brasileiros de

Acinetobacter (Vasconcelos et al., 2015; Pagano, Martins e Barth, 2016; Tavares, 2017).

Considerando a distribuição das diversas oxacilinases ao redor do mundo e sabendo que estas podem estar associadas a elementos genéticos móveis, como integrons, transposons, ilhas de resistência e sequências de inserção e promoverem superexpressão genética, tornam-se primordiais propor medidas para a contenção ou eliminação dessas cepas (Tavares, 2017).

O elemento de inserção *ISAb_a1* é o mais prevalente em *A. baumannii* (Villalón et al., 2013), porém outros elementos de inserção, como *ISAb_a2*, *ISAb_a3* e *ISAb_a4*, apesar de menos frequentes, já foram identificados à montante do gene *bla_{OXA}* em *Acinetobacter* spp. (Poirel e Nordmann, 2006). Diferentes tipos de *ISAb_a* permitem caracterizar os transposons, que contribuem para a disseminação desses genes de resistência (Poirel, Bonnin e Nordmann, 2011), sendo o *Tn2006* o transposon mais comum entre *A. baumannii* (Lee, Chang e Su, 2012).

Há, também, outros elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, que contribuem para a variabilidade genética promovendo a transferência horizontal de genes entre bactérias através de conjugação e transformação (Carattoli et al., 2005).

Apesar das enzimas serem as mais importantes epidemiologicamente quando trata-se de resistência, as bombas de efluxo também contribuem para esse fato, visto que são proteínas presentes na membrana e participam da captação de nutrientes essenciais e íons, excreção de produtos do metabolismo bacteriano e também estão relacionadas à patogenicidade da bactéria, entre outras (Magnet, Courvalin e Lambert, 2001; Li and Nikaido, 2004).

Estas se categorizam em cinco classes de transportadores: superfamília dos facilitadores principais (MFS), família de extrusão de multidrogas e compostos tóxicos (MATE), família resistência-nodulação-divisão (RND), família de baixa resistência a multidrogas (SMR) e superfamília cassete de ligação de ATP (ABC), sendo que todas as classes agem através de troca de prótons, com exceção da ABC que atua por hidrólise de ATP (Dzidic, Suskovic e Kos, 2007).

Em *A. baumannii*, a resistência aos antimicrobianos está geralmente associada com as famílias MFS e RND (Vila et al., 2007).

As bombas de efluxo MFS normalmente não são transportadores multidrogas, mas funcionam como exportadores específicos para certas classes antimicrobianas e, em *A. baumannii*, as principais desta categoria são Tet(A), que confere resistência à tetraciclina, e Tet(B), que confere resistência à tetraciclina e minociclina (Martí et al., 2006).

A família RND consiste em um sistema tripartido, denominado AdeABC, em que AdeA é a proteína de fusão de membrana, AdeB é o transportador de múltiplas drogas e AdeC é a proteína de membrana externa. A superexpressão dessa bomba de efluxo confere resistência a aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, cloranfenicol e tetraciclinas (Magnet, Courvalin and Lambert, 2001; Marchand et al., 2004) e diminuição da suscetibilidade às fluoroquinolonas (Higgins et al., 2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu *A. baumannii* resistente à múltiplas drogas no grupo crítico de bactérias, priorizando as pesquisas para tratamentos antimicrobianos (OMS, 2017).

Com isso, é possível observar que as bactérias do gênero *Acinetobacter* spp. tornaram-se uma preocupação devido à sua capacidade de causar surtos e à disseminação de clones resistentes aos antimicrobianos. O *Centers for Disease Control* (CDC) estima que 12.000 IRAS causadas por *A. baumannii* ocorram anualmente e que aproximadamente 63% desses isolados sejam multirresistentes (CDC, 2013).

O contexto epidemiológico-molecular de *A. baumannii* é complexo (Martins e Barth, 2013); entretanto, a literatura mostra que, para isolados com resistência aos carbapenêmicos, há circulação predominante de determinados clones, cujo sucesso na disseminação pode estar associado ao carreamento de genes de resistência e exposição a um ambiente de seleção, fenômeno ecológico denominado de *bottleneck* (Diancourt et al., 2010), que ocasiona a seleção de cepas resistentes e posterior expansão clonal.

Enquanto a tipagem molecular visa estabelecer o parentesco entre isolados pertencentes à mesma espécie, a epidemiológica correlaciona possíveis ligações entre casos. Nas últimas décadas, a tipagem bacteriana alterou-se gradualmente de fenotípica para molecular e finalmente aos métodos genômicos (van Belkum et al., 2007).

Dados moleculares obtidos por PFGE, PCR ou mesmo MLST, demonstram, constantemente, policlonalidade, retratando que o estudo da evolução dos surtos é complicada, especificamente devido às baixas taxas de sensibilidade e desempenhos de programas de vigilância para detecção de sintomas assintomáticos, portadores ou reservatórios ambientais (Marchaim et al., 2007b, Nutman et al., 2016).

Há dois esquemas de MLST utilizados para detectar os Complexos Clonais em *A. baumannii*, o primeiro foi introduzido por Bartual e colaboradores (2005) e é referido como esquema de Oxford e, posteriormente, foi publicado por Diancourt e colaboradores (2010), e é atualmente o esquema do Instituto Pasteur. Ambos utilizam sete genes constitutivos, porém possuem apenas três genes em comum: *cpn60* (gene codificador da proteína chaperonina), *recA* (gene codificador do fator de alongação homólogo) e *gltA* (gene codificador da proteína citrato sintase). O esquema de Oxford tende a ser mais discriminatório, especialmente quando se trata dos STs pertencentes ao CC2 (Tomascheck et al., 2016), porém um estudo realizado por Hamidian, Nigro e Hall (2017) revelou que o esquema do Instituto Pasteur oferece uma melhor representatividade do genoma bacteriano.

Um estudo de Turton e colaboradores (2007) elaborou um esquema simplificado de tipagem de *A. baumannii* conhecido como 3LST, contemplava apenas a identificação de IC1, IC2 e IC3, que podem não ser os predominantes em determinados cenários, como o brasileiro. De acordo com isto, Martins e colaboradores propuseram em 2016 um novo esquema de tipagem clonal por m3LST, especialmente adequado à realidade brasileira, tendo em vista que o método de Turton e colaboradores (2007) detectava apenas o Complexo Clonal CC1, porém os Complexos CC15 e CC79 também são prevalentes e há o CC25 que é emergente (Martins et al., 2016; Tavares, 2017). Assim como o 3LST, o m3LST resume-se em uma única reação de PCR multiplex baseada na amplificação dos genes *csuE*, *ompA* e do gene *bla_{OXA-51}-like*. Tal método foi validado pelo trabalho de Vasconcellos e colaboradores (2017) em amostragem maior e mais diversificada.

Atualmente, são reconhecidos os denominados Clones Internacionais (IC) 1, 2 e 3, mundialmente disseminados, frequentemente associados à resistência

antimicrobiana, os quais foram inicialmente descritos baseados em tipagem por AFLP (*amplified fragment lenght polymorphism*), mas que se encontram associados ao MLST (Karah et al., 2012). Os ICs mais prevalentes na América do Sul são IC5 (CC79) e IC7 (CC25), ainda que este último seja considerado emergente, e isso difere da situação na América do Norte e Europa, onde IC2 (CC2) é a linhagem predominante (Cerezales et al., 2019). O IC2 foi relatado no Brasil no passado, quando isolados ST2 produtores de OXA-23 foram descritos de 1999 a 2003, mas não foram novamente descritos a partir de 2004 (Dalla-Costa et al., 2003; Martins et al., 2013).

Durante um estudo de Levy-Blitchtein e colaboradores (2018), foi destacado que há circulação de Clones Internacionais epidêmicos II e III no Peru, situação extremamente preocupante já que anteriormente os casos eram ausentes.

Cepas pertencentes aos Complexos Clonais CC1, CC15 e CC79, denominados de clones de alto risco (Medeiros e Lincopan, 2013) são as mais relatadas no Brasil, mas a ocorrência de outros clones alerta para a necessidade de constante monitoramento. Por exemplo, isolados do CC25 figuram entre os que recorrentemente são relatados no país (Chagas et al., 2014; Vasconcelos et al., 2015; Camargo et al., 2016; Rocha et al., 2017).

Em um hospital de ensino no Brasil, foram observadas cepas circulantes com predomínio dos Complexos Clonais CC1 (ST1 e ST986), CC15 (ST15), CC79 (ST79, ST175 e ST730) e CC317 (ST317), sendo este último pouco relatado em estudos pelo mundo, porém bastante frequente entre 2008 e 2010 (Tavares et al., 2019). O ST317 foi primeiramente identificado em 2009 a partir de uma amostra não identificada no Rio de Janeiro e a única outra cepa que foi depositada na base de dados do MLST foi detectada no Estado de São Paulo, isolada de secreção do trato superior em 2011 (Camargo et al., 2016), provavelmente, indicando uma propagação desse clone nesse período, apenas no Brasil. A análise dos dados do estudo de Tavares e colaboradores (2019), indica que o CC317 causa resistência menos pronunciada ao sulfametoxazol-trimetopima, tigeciclina e ampicilina-sulbactam, indicando que, pelo menos em parte, a resistência pode gerar mudanças na prevalência de clones em contextos específicos sob pressão seletiva.

Pagano e colaboradores (2018) realizaram um estudo focado em dois períodos de CRAB na cidade de Porto Alegre, o primeiro período foi um surto entre 2007 e 2008, e o segundo foi durante um período endêmico entre 2013 e 2014, sendo que no primeiro período do estudo foi observado a prevalência de CC15 (38,7%) e CC79 (16,1%), já no segundo período foi detectado também o CC2, comumente encontrado na Europa, porém esporádico na América do Sul.

Os representantes do CC25 apresentam-se em menor frequência na América do Sul e mais especificamente no Brasil, sendo detectados apenas casos esporádicos (Chagas et al., 2014), porém em países asiáticos e europeus, o ST25 já foi responsável por epidemias e vêm demonstrando bastante frequência na região noroeste da Argentina (Karah et al., 2012; Rodríguez et al., 2019). Em um estudo recente avaliando isolados de diferentes regiões do estado de São Paulo, cepas carreadoras de OXA-23 e pertencentes ao CC25 foram detectadas na região metropolitana da capital (Camargo et al., 2016). Em 2013 foi descrito o primeiro caso de *A. baumannii* ST25 produtor de NDM-1 (*New Delhi metallo-beta-lactamase*) no Brasil. Esta enzima possui uma rápida disseminação, estando localizada tanto em plasmídeos como em cromossomos e compromete a eficácia da maioria dos beta-lactâmicos, exceto aztreonam (Pillonetto et al., 2014; Dortet et al., 2014). Em um estudo genômico comparando sequências de genoma total de diversos isolados de *A. baumannii*, pertencentes ao ST25, isolados de diversas localidades do mundo, Sahl e colaboradores (2015) verificaram que mesmo em linhagens de derivação recente, a plasticidade genômica garante variabilidade fenotípica, como a resistência aos fármacos.

Em um estudo de Rodríguez e colaboradores (2016), observou-se que o CC25 foi o grupo mais prevalentemente encontrado na Bolívia. Essa prevalência sugere uma mudança na epidemiologia das cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos neste país (Cerezales et al., 2019).

No Brasil, isolados pertencentes ao ST107 estão relacionados à OXA-231, podendo também ser considerado de rara ocorrência, mas potencialmente emergente, uma vez que já foi causador de surto hospitalar no Hospital São Paulo (Costa, 2015; Camargo et al., 2016).

Segundo estudo de Girlich e colaboradores (2014), houve um único relato no Brasil de uma cepa de *A. baumannii* da cidade de Belo Horizonte pertencente

ao ST113, que é relacionado à OXA-253, variante da OXA-143, mesmo ST associado a outras 12 cepas positivas para *bla*_{OXA-253} de Recife, nas quais esta variância foi descrita, destacando potencial para este gene se disseminar ainda mais.

Estudos publicados no Brasil nos últimos anos citam o surgimento de novos STs, como ST25, ST981, ST982, ST986 (de Azevedo et al., 2018), ST984, ST985 e ST987, fator preocupante devido a ampla resistência desse patógeno (de Azevedo et al., 2019).

Para estudos com um contexto mais definido, a técnica de eletroforese em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) é uma das mais indicadas (Tenover et al., 1997; Towner et al., 2008). O PFGE consiste na separação de fragmentos grandes de DNA após clivagem por enzimas com quantidade limitada de sítios de restrição (Smith e Condemine, 1990) e logo após, é realizada uma eletroforese em campo pulsado. O campo elétrico desta permite a separação de moléculas de DNA maiores que 12 Mb, permitindo o agrupamento dos isolados através da comparação do padrão de macrorestrição (Den Dunnen e Van Ommen, 1992; Mahalingam et al., 1994; Dijkshoorn et al., 2001; Fitzgerald et al., 2001; Magalhães et al., 2005).

Apesar de ser uma técnica muito importante para o estudo epidemiológico de bactérias, visto que pode ser utilizada para determinação de um surto hospitalar, esta não pode ser utilizada isoladamente devido às variações fenotípicas e à pressão seletiva à qual o patógeno está exposto (Vaz, 2007).

Diante da necessidade do monitoramento mais próximo de organismos resistentes aos antimicrobianos, análises genômicas mais robustas têm sido utilizadas. O sequenciamento de nova geração (também chamado de *next generation sequencing* ou *whole genome sequencing*) de *A. baumannii* tem auxiliado a confirmar a disseminação clonal de organismos com resistência aos antimicrobianos (Salipante et al., 2015; Holt et al., 2016; Meumann et al., 2019).

Este método é, no momento, considerado o mais discriminatório e definitivo na caracterização de patógenos. Atualmente, há uma tendência mundial em se acelerar a detecção de resistência antimicrobiana em diferentes patógenos, com objetivo de fornecer informações relevantes para o tratamento e monitoramento das infecções. Uma ressalva quanto à implantação do NGS para prever a

resistência antimicrobiana, entretanto, precisa ser levantada: os bancos de dados contendo os determinantes genéticos de resistência para análise genômica precisam ser constantemente atualizados, uma vez que novos mecanismos podem surgir e não serem detectados nos *pipelines* ora disponíveis (Ellington et al., 2017).

Os resultados da aplicação da tecnologia de NGS para sequenciamento de genomas apresenta ainda outra perspectiva, a do estudo epidemiológico. Por meio da comparação de polimorfismos em um único nucleotídeo (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*), é possível traçar a filogenia dos isolados (Lewis et al., 2010; Li et al., 2015; Fitzpatrick et al., 2016; Chen et al., 2018). Quando todo o genoma é analisado em busca de variações em genes considerados constitutivos, pode-se criar um banco de dados de alelos para comparação interlaboratorial, o chamado core-genome ou whole-genome MLST (cgMLST, ou wgMLST), que atualmente é cotado para substituir as análises de SNPs, que necessitam de recálculos para cada nova entrada (Willems et al., 2016; Schurch et al., 2018).

Para *A. baumannii*, o esquema de wgMLST foi desenvolvido e validado em 2017, e apresentou capacidade de assinalar corretamente cepas endêmicas de surtos previamente caracterizados, tendo os resultados comparáveis aos perfis gerados por PFGE, mas num maior nível de discriminação (Higgins et al., 2017).

O nível de discriminação obtido pelo NGS é considerado atualmente o estado-da-arte em técnicas de tipagem, e tem particular interesse na elucidação de transmissão de patógenos causadores de surtos, por permitir rastrear a origem e evolução da disseminação das cepas e permitir a investidura de medidas práticas para quebra da cadeia de transmissão (Salipante et al., 2015; Fitzpatrick et al., 2016).

Embora os genomas atuais disponíveis forneçam uma imagem incalculável da evolução e disseminação de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos, em grande parte do mundo, a escassez de dados de sequências genômicas disponíveis ao público de regiões como Europa, Rússia, Oriente Médio, África e América do Sul faz com que seja difícil desenhar uma imagem global precisa da disseminação dos clones de *A. baumannii*, genes de resistência a carbapenêmicos e sua filogenia (Hamidian e Nigro, 2019).

Notavelmente, embora a OXA-23 seja predominante no Brasil, em países como Espanha, Alemanha ou Tunísia esta enzima não é muito encontrada, enfatizando ainda mais a necessidade de mais cobertura de sequenciamento para entender por que esses diferentes genes de resistência dominam em diferentes regiões. Cepas de sequenciamento de diversas regiões são vitais para entender a trajetória evolutiva dos principais clones globais, bem como de outros clones emergentes (Hamidian e Nigro, 2019), como CC25 e ST107. Indícios da microevolução destes clones podem estar presentes em seus genomas.

Considerando as elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos em *Acinetobacter*, as quais refletem em altos índices de morbidade e mortalidade, torna-se essencial o conhecimento da sua epidemiologia a partir de estudos moleculares. A investigação de isolados clínicos pertencentes aos clones emergentes mostra-se necessária, visto que há uma escassez de dados sobre estas cepas no país e que suas taxas de resistência frente aos carbapenêmicos, polimixina B e à outros fármacos têm sido observadas em um número crescente, tornando-se um fator preocupante para a saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a análise genômica e caracterizar a sensibilidade aos antimicrobianos em clones emergentes (não pertencentes aos Complexos Clonais 1, 15 e 79) de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de diferentes hospitais brasileiros.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os genes de oxacilinases presentes;
- Avaliar a clonalidade por eletroforese em campo pulsado (PFGE);
- Identificar presuntivamente os clones emergentes (não pertencentes aos Complexos Clonais 1, 15 e 79) por PCR Multiplex;
- Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos qualitativamente e quantitativamente;
- Avaliar o uso de espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de clones emergentes;
- Elucidar a estrutura genômica dos clones emergentes por meio de sequenciamento de genoma completo;
- Estabelecer correlações entre os clones emergentes, sua estrutura genômica e a susceptibilidade aos fármacos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de amostras

Durante os anos de 2016 e 2017, foram recebidos no Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) 134 isolados previamente identificados como Complexo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (ACB) ou *Acinetobacter* spp. isolados de secreção traqueal, líquido, sangue, urina, entre outros materiais clínicos, para identificação de espécie e caracterização da suscetibilidade antimicrobiana, provenientes de hospitais da região metropolitana de São Paulo e dos 12 Laboratórios Regionais do IAL que compõem a Rede Estadual de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana. Foram recebidas também cepas de suspeitas de surtos dos estados da Bahia, Sergipe, Tocantins, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, conforme definição da Portaria do Ministério da Saúde Nº 3.120, de 17 de dezembro de 2013, que estabeleceu o IAL como laboratório de referência regional para a caracterização de surtos por Bacilos Gram-negativos multirresistentes aos antimicrobianos para essas localidades.

Com a finalidade de selecionar isolados representantes de pulsotipos diferentes de *A. baumannii*, foi utilizada a técnica de PFGE como triagem das amostras, sendo totalizados 94 isolados. Após isso, foi realizada a metodologia de m3LST para verificar a qual complexo clonal cada cepa pertencia, com isso, restaram 13 cepas que eram pertencentes aos complexos clonais emergentes.

Com o intuito de aumentar o número de amostras a serem estudadas, foram acrescentados três isolados de 2013 (Tavares et al., 2009; Camargo et al., 2013) e dois de 2018 já caracterizados por PFGE e m3LST, resultando em 18 cepas neste trabalho.

3.2 PCR Multiplex para confirmação de *A. baumannii* e detecção das Oxacilinases

Os isolados foram submetidos à reação de PCR multiplex para os genes *bla*_{OXA-51-like} (este sendo intrínseco em *A. baumannii*), *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24/40-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like} (Woodford et al., 2006, Higgins et al., 2010). A sequência dos primers e o tamanho dos amplicons estão listados na Tabela 1.

Para esta etapa, o DNA total bacteriano foi extraído por meio da técnica de lise térmica, sendo dissolvidas três colônias isoladas em 1 mL de água ultrapura estéril em um microtubo estéril de volume 1,5 mL (Eppendorf, Axygen). Após homogeneização em vórtex (Labnet), os tubos foram aquecidos a 95°C por 10 minutos em termobloco (AccuBlock Digital Dry Bath, Labnet) e centrifugados (Eppendorf) a 4°C por 10 minutos a 12000 rpm. Após este processo transferiu-se o sobrenadante a um novo microtubo que foi armazenado a -20°C para as análises posteriores.

Para a reação de PCR, foi preparado um tubo para cada amostra em volume final da reação de 20 µL, incluindo 5 µL de água ultrapura estéril; 0,4 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (IDT – Integrated DNA Technologies) específico na concentração de 10 µM (concentração final de 0,2 µM); 10 µL de Mix 2X concentrado (Promega) e 1 µL de DNA. Posteriormente, estes microtubos foram incubados em termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied BioSystems), seguindo os parâmetros de amplificação (desnaturação inicial 94°C/5 min, 30 ciclos de 94°C/25 seg, 52°C/40 seg, 72°C/50 seg e extensão final de 72°C/6 min). Após o término dos ciclos, as amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose (Agarose LE, EasyPath) a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X (Anexo) (UltraPure TBE Buffer, Invitrogen) para eletroforese a 100V, por 40 minutos (Cuba: Bio-rad/Estabilizador: Lark Stabilizers).

Para estimar o tamanho dos produtos amplificados, marcador de peso molecular de 100 pb (Cellco) foi adicionado a cada gel. Para controle de qualidade, amostras previamente caracterizadas foram utilizadas como controle positivo (Camargo et al., 2016) e água ultra-pura como controle negativo. A seguir, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob o auxílio de luz ultravioleta em fotodocumentador (DNR - Bio-Imaging Systems – Modelo MiniBis Pro).

Tabela 1: Sequência de primers e tamanhos dos amplicons utilizados para detecção dos genes de oxacilinas em *A. baumannii*.

Genes alvos	Primers	Sequências (5' – 3')	Tamanhos dos amplicons (pb)
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	OXA-23F OXA-23R	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCCAT	501
<i>bla</i> _{OXA-24-like}	OXA-24F OXA-24R	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	OXA-51F OXA-51R	TAATGCTTTGATCGGCCTTG GGATTGCACTTCATCTTGG	353
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	OXA-58F OXA-58R	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599
<i>bla</i> _{OXA-143-like}	OXA-143F OXA-143R	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT TAATCTTGAGGGGGCCAACC	149

Fonte: Woodford et al., 2006; Higgins et al., 2010

3.3 Determinação da diversidade genética por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

Para determinar a diversidade genética entre os isolados, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, do inglês *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) de acordo com o protocolo padronizado por Seifert e colaboradores (2005).

3.3.1 Preparo das amostras

Primeiramente os isolados foram semeados em meio Tryptic Soy Agar (TSA) e incubados por 20-24h a 30°C. A partir do crescimento obtido, foi preparada uma suspensão bacteriana ajustada aproximadamente à transmitância de 15% em espectrofotômetro (Analyser) em Tampão de Suspensão Celular (Anexo).

Desta suspensão, 200 µL foram aliquotados em um microtubo de centrífuga de 1,5 mL, que foram incubados por 10 minutos, a 55°C, em termobloco (AccuBlock Digital Dry Bath, Labnet). Após este período, 10 µL de proteinase K (solução 20 mg/mL, Bioline) e 5 µL de lisozima (solução de 40 mg/mL, Serva) foram acrescentados ao tubo e misturados gentilmente. Em seguida, 200 µL de

agarose SeaKem Gold (Lonza, Rockland, EUA) à concentração de 1% em tampão TE (Anexo), fundida e estabilizada à temperatura de 55 a 60 graus, foi adicionado a cada um dos tubos e, após homogeneização, a mistura foi rapidamente distribuída em moldes para preparo dos blocos (BIORAD). Após 5 minutos à temperatura ambiente e mais 5 minutos em geladeira, os blocos estavam solidificados. A seguir, os blocos foram transferidos para tubos Falcon contendo 5 mL de tampão de lise celular (Anexo A) com 25 µL de proteinase K (solução 20 mg/mL) e incubados a 55°C, por 2 horas, sob agitação constante (150 a 200 rpm) em agitador orbital (Shaker Classic C25, New Brunswick).

Após o período de lise, todo o tampão de lise celular foi retirado e em cada tubo foi adicionado aproximadamente 10 mL de água ultrapura pré-aquecida a 55°C e os tubos foram novamente incubados em agitador a 55°C, 150-200 rpm, por 15 minutos. Esse processo foi repetido por mais três vezes com água. Posteriormente, a lavagem dos blocos foi realizada com aproximadamente 10 mL de TE pré-aquecido a 55°C. Os tubos foram novamente incubados sob as mesmas condições, repetindo o mesmo processo por mais 4 vezes. Ao final das lavagens, foi adicionado 10 mL de TE à temperatura ambiente e os blocos de agarose foram estocados a 4°C até o momento da digestão.

3.3.2 Digestão das amostras com enzima de restrição

Os blocos foram cortados com uma lâmina, com largura aproximada de 2 mm e transferidos para microtubos contendo 100 µL de mix (Buffer, BSA, enzima e água) (Anexo) para serem submetidos à digestão da enzima Apal (Promega, concentração final de 30 U/bloco de agarose) e incubados em banho-maria a 37°C, por 16-18h.

3.3.3 Preparo do gel e eletroforese

Foram preparados 100 mL de gel de agarose SeaKem Gold à concentração de 1% em TBE 0,5X (Anexo) fundido e estabilizado à temperatura de 55 a 60 graus.

Decorrido o período de incubação, os blocos de agarose com DNA digeridos foram aplicados no pente de montagem do molde específico para

preparo de gel de PFGE, o qual foi posteriormente preenchido com a agarose previamente preparada e estabilizada, de maneira delicada para não mover os blocos. Para normalização dos géis, marcador de peso molecular Lambda Ladder PFGE Marker (New England Biolabs) foi colocado em, pelo menos, três linhas de cada gel para, além de normalização, realize a comparação entre os experimentos. O gel permaneceu em temperatura ambiente por 30 minutos para completa solidificação.

A eletroforese foi realizada no equipamento CHEF-II (BIORAD), com tampão TBE 0,5x e temperatura ajustada a 14°C, nas seguintes condições:

- Tempo: 19 horas
- Pulso inicial: 5 segundos
- Pulso final: 20 segundos
- Voltagem: 6 V/cm

Ao término da eletroforese, o gel foi corado por 30 minutos com uma solução de brometo de etídio (Sigma-Aldrich) 1 µg/mL e descorado em água destilada sob 3 lavagens de 15 minutos cada. As imagens dos géis foram capturadas sob iluminação ultravioleta em fotodocumentador (DNR – Bio Imaging Systems – Modelo MiniBis Pro) e as fotos foram submetidas à análise pelo software BioNumerics versão 7.6.2 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

3.3.4 Análise de dados

A análise da relação genética entre os perfis eletroforéticos foi feita utilizando-se o método UPGMA (*unweighted pair group method with mathematical averaging*) com o coeficiente de Dice, utilizando-se otimização e tolerância de 1,5% (Seifert et al., 2005). O pulsotipo foi definido como cada padrão eletroforético com 100% de similaridade.

3.4 Identificação presuntiva dos complexos clonais por m3LST

Para identificação presuntiva dos complexos clonais circulantes no Brasil, foi realizada a metodologia m3LST, que consiste em uma reação de PCR multiplex (Martins e colaboradores, 2016). Esta reação possui o volume final de 20 μ L, com 3,2 μ L de água ultrapura estéril; 10 μ L de Mix 2X concentrado (Promega); 0,6 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador (ompA-FM; ompA-RM; omp-RBM; csuE-FM; csuE-FBM; csuE-RM; OXA-51-FM; OXA-51-RM) (Sigma) na concentração de 10 μ M (concentração final de 0,3 μ M) e 1,0 μ L de DNA (Tabela 2).

Posteriormente estes microtubos foram incubados em termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied BioSystems), seguindo os parâmetros de corrida (desnaturação inicial 95°C/3 min, 25 ciclos de 95°C/1 min, 57°C/30 seg, 72°C/30 seg e extensão final 72°C/3 min). Após o término dos ciclos, as amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose a 1,5% em TBE 0,5X para eletroforese a 100V, por 40 minutos. Para inferência do tamanho dos produtos amplificados, marcador de peso molecular de 100 pb foi adicionado a cada gel. Para controle de qualidade, amostras previamente caracterizadas foram utilizadas com controle positivo (Camargo et al., 2016) e água ultra-pura como controle negativo. A seguir, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob o auxílio de luz ultravioleta em fotodocumentador (DNR - Bio-Imaging Systems – Modelo MiniBis Pro).

Para controle de qualidade das reações e interpretação dos resultados, foram usados os controles IC1 (CC1); IC2 (CC2); IC3 (CC15); CC79 e CC25. (Tabela 3)

Tabela 2: Sequência dos primers utilizados para a identificação dos genes dos complexos clonais em *Acinetobacter*.

Genes	Primers	Sequências (5' – 3')
<i>ompA</i>	ompA-FM	TGGCGGTAAAGATGGTAAC
	ompA-RM	CCTAAAGTACCTTCTTCTGAGTTAC
	ompA-RBM	TTCCAGAACTCTCATCAGC
<i>csuE</i>	csuE-FM	CGATTGTGGGAATCGGTGCC
	csuE-RM	CACATAATATGGTGTATTTACCGAA
	csuE-RBM	TTGGCGAACATGACCTATT
<i>bla_{OXA-51}-like</i>	OXA-51-FM	AGTATTTAAGTGGGACGGGC
	OXA-51-RM	CGACGAGCTAAATCTTGATAAACC

Fonte: Martins et al., 2016

Tabela 3: Interpretação dos resultados da detecção dos complexos clonais em *Acinetobacter*.

Controles	Tamanhos dos amplicons (pb)
IC1 = CC1	531
	239
IC2 = CC2	423
IC3 = CC15	423
	114

CC79	423
	327
CC25	239
	114

Fonte: Martins et al., 2016

3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para definir a suscetibilidade aos antimicrobianos, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo em microplaca comercial contendo os fármacos já adsorvidos (Sensititre GNX3F, Thermo Scientific). Foi avaliada a suscetibilidade para os antimicrobianos amicacina, doxicilina, gentamicina, minociclina, tobramicina, tigeciclina, ciprofloxacina, sulfametozasol-trimetopima, levofloxacina, aztreonam, imipenem, cefepime, meropenem, colistina, polimixina B, ceftazidima, cefotaxima, ampicilina-sulbactam, doripenem, piperacilina-tazobactam e ticarcilina-ácido clavulânico (Figura 6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMI 4	GEN 1	TOB 1	CIPRO 0,06	SXT 0.5/9.5	AZT 2	FEP 2	COL 0,25	COL 0,5	COL 1	COL 2	COL 4
B	AMI 8	GEN 2	TOB 2	CIPRO 0,12	SXT 1/19	AZT 4	FEP 4	POL 0,25	POL 0,5	POL 1	POL 2	POL 4
C	AMI 16	GEN 4	TOB 4	CIPRO 0,25	SXT 2/38	AZT 8	FEP 8	TAZ 1	TAZ 2	TAZ 4	TAZ 8	TAZ 16
D	AMI 32	GEN 8	TOB 8	CIPRO 0,5	SXT 4/76	AZT 16	FEP 16	FOT 2	FOT 4	FOT 8	FOT 16	FOT 32
E	DOX 2	MINO 2	TGC 0,25	CIPRO 1	LEVO 1	IMI 1	MERO 1	A/S2 4/2	A/S2 8/4	A/S2 16/8	A/S2 32/16	A/S2 64/32
F	DOX 4	MINO 4	TGC 0,5	CIPRO 2	LEVO 2	IMI 2	MERO 2	DOR 0,5	DOR 1	DOR 2	DOR 4	Pos
G	DOX 8	MINO 8	TGC 1	TGC 4	LEVO 4	IMI 4	MERO 4	P/T4 8/4	P/T4 16/4	P/T4 32/4	P/T4 64/4	Pos
H	DOX 16	MINO 16	TGC 2	TGC 8	LEVO 8	IMI 8	MERO 8	TIM2 16/2	TIM2 32/2	TIM2 64/2	TIM2 128/2	Pos

Figura 5. Esquema representativo da organização das placas de microdiluição em caldo. Ami= amicacina; Dox= doxicilina; Gen= gentamicina; Mino= minociclina; Tob= tobramicina; Tgc= tigeciclina; Cipro= ciprofloxacina; Sxt=

sulfametoazol-trimetopima; Levo= levofloxacina; Azt= aztreonam; Imi= imipenem; Fep= cefepime; Mero= meropenem; Col= colistina; Pol= polimixina B; Taz= ceftazidima; Fot= cefotaxima; A/S2= ampicilina-sulbactam; Dor= doripenem; P/T4= piperacilina-tazobactam; TIM2= ticarcilina-ácido clavulânico; Pos= controle positivo.

Para realização desta técnica, foi feito um inóculo correspondente à escala 0,5 de McFarland, preparado por meio da adição de 3 a 5 colônias de crescimento recente (<24h) em tubos contendo água estéril (fornecidos pelo fabricante). Após vigorosa homogeneização, 10 µL desta solução foram adicionados em tubo com 11 mL de caldo Mueller Hinton cátion ajustado (CMHCA), também fornecido pelo fabricante, e novamente homogeneizados. Cinquenta microlitros desta solução foram inoculados a cada orifício da microplaca de 96 poços contendo os antimicrobianos e a placa foi selada com adesivo fornecido pelo fabricante. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 20-24h com imediata leitura dos resultados (Anexo).

Para a leitura foi avaliada qual o valor da CIM corresponde à menor concentração capaz de inibir o crescimento visível (a olho nu) da bactéria. Para isso, foram utilizados os pontos de corte definidos pelo CLSI, documento M100S30 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2020).

Para controle de qualidade do teste foram utilizadas as cepas padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

De acordo com o protocolo do fabricante das placas Sensititre, Thermo Scientific, a capacidade das placas com antimicrobiano liofilizado para detectar resistência à minociclina em *Acinetobacter* spp. é desconhecida, pois cepas resistentes não estavam disponíveis no momento de validação do teste (Bula da placa GNX3F). Frente a esta limitação, os isolados que apresentam não-suscetibilidade à minociclina foram avaliados também por gradiente de concentração (Etest, Biomérieux e Oxoid, M.I.C Evaluators) e por microdiluição em caldo com placas preparadas “*in house*”. Da mesma maneira, todos os isolados com não-suscetibilidade à polimixina B foram também avaliados por microdiluição em caldo com placas preparadas “*in house*” para confirmar os resultados obtidos.

Para a preparação da placa contendo diluições seriadas dos antimicrobianos, CMHCA (Difco) foi devidamente preparado e calculadas as

concentrações de uso (1 mg/L) dos antimicrobianos a serem testados a partir de sua solução estoque (10 mg/L) (Anexo).

Para este teste foi preparado, em tubo falcon, as soluções de Polimixina B (Sigma) e Minociclina (Sigma), separadamente, em CMHCA. Setecentos e cinquenta microlitros de caldo foi aliquoteado em cada tubo, exceto no primeiro, ao qual foi aliquoteado 1,5 mL da solução à concentração de 64 µg/mL para Polimixina e 32 µg/mL para Minociclina, pois, a partir destes, foram feitas as diluições seriadas na proporção 1:2 para os demais tubos. Cinquenta microlitros de cada tubo foram aliquoteados nas linhas A à H de uma microplaca de 96 poços de poliestireno com fundo em U, estéril e com tampa (Global Trade Technology), utilizando micropipetador multicanal.

As suspensões bacterianas foram ajustadas na escala 0,5 McFarland em salina. Em microtubos estéreis autoclavados, foi feita uma diluição 1:150, adicionando 1490 µL de CMHCA e 10 µL da suspensão. Em seguida, cinquenta microlitros da mistura correspondente a cada isolado foi dispensado na placa, resultando em uma diluição 1:2 da concentração do antimicrobiano previamente aliquoteado (assim, a concentração final da placa de Polimixina variou de 32 a 0,25 e de Minociclina de 16 a 0,125).

Para a validação dos testes com Polimixina B foram utilizadas as ATCC de *E. coli* 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* 27853 e para a Minociclina, ATCC de *S. aureus* 29213 e *E. coli* 25922.

3.6 Perfil de Análise Populacional (PAP)

É um método de análise de subpopulações modificadas usando concentrações seriadas do antibiótico e da própria bactéria, a fim de quantificar as populações bacterianas viáveis nessas concentrações. Essa metodologia tem sido a abordagem mais confiável e reprodutível, sendo considerada o teste padrão-ouro para hVISA (*Staphylococcus aureus* heterorresistente a vancomicina) (Wootton et al., 2001). Esta foi realizada para verificar uma possível heterorresistência para polimixina B, porém não há estudos que demonstrem que há um padrão para este fármaco.

O PAP foi utilizado para cada isolado resistente à polimixina e às cepas de controle de qualidade *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Um

conjunto de dezesseis placas de ágar Mueller Hinton (MH) (Oxoid) contendo concentrações de 2-log de polimixina B variando de 0,5 a 32 µg/mL, foram preparadas, bem como uma placa de controle para a contagem de inóculo. Os isolados bacterianos foram cultivados por 16 a 18 horas em meio sólido e, em seguida, suspensos a uma concentração equivalente à escala de 0,5 McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL). O inóculo das bactérias foi diluído em série em solução salina estéril para atingir as concentrações finais de 10^7 a 10^0 células/mL e inoculado nas placas de ágar MH contendo as diferentes concentrações de polimixina B. As placas foram incubadas por 24h e as colônias foram contadas em placas contendo 10 a 100 unidades formadoras de colônia (UFC). Cada isolado foi testado em três experimentos distintos, em três dias diferentes, e os dados são apresentados como a média +/- desvio padrão. Os dados da contagem de UFC foram analisados em gráfico em função da concentração de polimixina B.

3.7 Extração de proteínas para o MALDI-TOF MS

Foi utilizado protocolo previamente padronizado por Hijazin e colaboradores (2012).

Inicialmente as cepas foram semeadas em ágar TSA ou nutriente (Oxoid), após o crescimento a 30°C por 20 a 24h, foi realizada uma alíquota de 1 mL do cultivo bacteriano em um microtubo previamente identificado e foi centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 300 µL de água ultrapura e 900 µL de etanol foram adicionados e misturados gentilmente e em seguida, os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos foram deixados com as tampas abertas em temperatura ambiente para secagem completa. Após, 50 µL de ácido fórmico (70%) foi adicionado, os tubos agitados, e, em seguida, 50 µL de acetonitrila (100%) foi também acrescentado. A mistura foi novamente agitada e centrifugada por 2 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido à um microtubo novo e armazenado a -20°C.

3.8 Caracterização e clonalidade por MALDI-TOF MS

Foi utilizado o espectrofotômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik) da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, com o auxílio técnico da Dra. Maria Inês Zanolli Sato e sua equipe, e as pesquisadoras da FMVZ USP Andrea Micke Moreno e Luisa Zanolli Moreno.

Para a captura dos espectros proteicos, 1 µL de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox de 96 poços e, após secar em temperatura ambiente, foi adicionado 1 µL de matriz polimérica (10 mg/ml *α*-cyano-4-hydroxycinnamic acid em 50% acetonitrila / 2.5% ácido trifluoroacético). Cada isolado foi distribuído em três poços e para cada placa foram realizadas três leituras. Para captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa FlexControl™ (Bruker Daltonics) pelo método MTB_autoX e amplitude de 2–20 kDa. O espectrofotômetro foi externamente calibrado através da utilização de proteínas ribossômicas de *Escherichia coli* (BTS - Bruker Daltonik).

Para a identificação microbiana foi utilizado o programa BioTyper™ 3.0 (Bruker Daltonics), a partir do qual foi realizada uma comparação dos espectros capturados de cada isolado com a biblioteca do fabricante. Pela comparação de presença/ausência de picos específicos obteve-se um valor de escore (*log (score) value*).

As réplicas de espectros proteicos foram utilizadas para produção de espectros de referência/médio ("*main spectrum*" - MSP) no programa BioTyper™ 3.0 (Bruker Daltonics). Estes foram utilizados para análise de agrupamento no programa Bionumerics.

3.9 Extração do DNA bacteriano para sequenciamento de genoma completo

O material genético das cepas de estudo foi extraído com o kit comercial Promega Wizard Genomic DNA Purification (Promega), com algumas modificações.

Inicialmente as cepas foram semeadas em ágar TSA ou nutriente (Oxoid) e uma colônia isolada foi inoculada em 3,5 mL de caldo Luria-Bertani (LB, BD, Difco) para realização da extração. Após crescimento a 30°C por 20 a 24 horas, 3 mL foram aliquotados em microtubos previamente identificados e centrifugados

por 2 minutos a 13000 rpm, para sedimentação das células bacterianas. O sobrenadante foi descartado e 600 µL da solução de lise (disponível no kit) foi adicionado e misturado gentilmente a cada tubo. Os tubos foram incubados a 80°C por 5 minutos em termobloco e, posteriormente, estabilizado à temperatura ambiente, por 10 minutos. A seguir, 3 µL da RNase (disponível pelo kit), 1 µL de Proteinase K e 1 µL de Lisozima foi adicionado a cada tubo, homogeneizado e incubado a 37°C, por 60 minutos em termobloco (tempo máximo recomendado pelo fabricante). Em seguida, os tubos foram retirados do termobloco e estabilizados à temperatura ambiente por 10 minutos. Duzentos microlitros de solução para precipitação de proteína (disponível pelo kit) foi acrescentado a cada tubo, homogeneizado vigorosamente em vortex, e incubados em gelo por 5 minutos. A seguir, foi centrifugado por 3 minutos a 13000 rpm (a fase da precipitação de proteínas foi realizada duas vezes já que foi observado que no sobrenadante ainda havia vestígios de precipitado). Depois desta fase, 600 µL do sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo contendo 600 µL de isopropanol (Merck, Alemanha), homogeneizado e centrifugado para formação de pellet. Após, os sobrenadantes foram novamente descartados e foram acrescentados 600 µL de etanol 70% à temperatura ambiente, misturados gentilmente e centrifugados novamente por 2 minutos, a 13000 rpm. A seguir, o etanol foi retirado e os tubos foram secos com as tampas abertas de ponta cabeça, dentro da estufa de 30°C por 15 minutos. Após a secagem completa, 50 µL de água ultrapura foi acrescentado a cada tubo para reidratação do DNA com incubação a 4°C por 24h.

No dia seguinte, foi transferido deste microtubo 15 µL para quantificação em Nanodrop (1,5 microlitro) (Thermo Scientific) e qualificação (10 microlitros) realizada em gel de agarose a 1% com eletroforese a 100 V, por 60 minutos. O gel corado por brometo de etídio foi visualizado em fotodocumentador (Bio-Imaging Systems).

No Nanodrop foram quantificadas as relações 260/280, 260/230 e a concentração ng/µL, nas quais os valores aceitos foram considerados os acima citados de 1,8, 2 e 50, respectivamente e para confirmar a qualidade dos produtos extraídos, foi acrescentado em cada gel o marcador de peso molecular

(Cellco). No caso de resultado insatisfatório em algum dos parâmetros, a extração foi repetida até alcançarmos resultados adequados.

3.10 Sequenciamento de Genoma Completo

Esta etapa foi realizada no Instituto Butantan, sob responsabilidade do pesquisador Dr. Enéas de Carvalho. As bibliotecas genômicas foram preparadas utilizando-se o Nextera® Sample Preparation e inserção do INDEX com Kit Nextera®Index. Os produtos da PCR foram purificados utilizando beads magnéticas AMPure XP e a seguir analisados na plataforma Illumina HiSeq (Illumina) com cartucho HiSeq® Rapid PE Cluster Kit v2 (Paired end). Ao fim da corrida esperou-se um total de leituras à ordem de 15 milhões, com tamanho médio do fragmento de 300 pares de bases, com cobertura aproximada de 30X.

Os dados brutos gerados (extensão.fastq) foram inicialmente analisados quanto à sua qualidade no software FasQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects). A seguir, as leituras foram concatenadas (de novo assembly) utilizando o software CLC. Os dados obtidos com o NGS foram analisados na plataforma online do Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/all.php>), que permite recuperar informações sobre identificação, tipagem e caracterização antimicrobiana para determinação do tipo de sequência (de acordo com os esquemas do Instituto Pasteur e Oxford) e genes de resistência antimicrobiana adquiridos.

A resistência antimicrobiana mediada por mutações pontuais em genes constitutivos (*pmrA*, *pmrB* e *lpx*) foi identificada manualmente usando o software BioNumerics v.7.6.2 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) usando como referência o genoma completo da ATCC 19606 de *A. baumannii* (NCBI NZ_KL810966.1) para numeração dos aminoácidos.

Para que possamos confirmar os dados sobre os STs, estes foram analisados pelo algoritmo BURST (eBURST), que subdivide grandes conjuntos de dados do MLST em grupos não sobrepostos de STs ou complexos clonais relacionados.

4. RESULTADOS

Abaixo encontram-se as informações gerais referentes aos isolados estudados (Tabela 4).

Tabela 4. Informações gerais referentes aos 18 isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos pertencentes aos clones emergentes estudados.

Isolado	Ano	Local	Sítio de isolamento	Perfil de sensibilidade	Oxacilinases	MLST Pasteur
IAL-14	2013	Bragança Paulista	Sangue	XDR	116, 23	ST25
IAL-39	2013	Presidente Prudente	Urina	XDR	64, 23	ST25
IAL-70	2013	São Paulo	Biópsia	XDR	64, 23	ST25
IAL-90	2018	São Paulo	Sangue	XDR	64, 23	ST25
IAL-156	2016	Assis	Sec. Traqueal	MDR	51, 23	ST163
IAL-207	2018	São Paulo	Sec. Traqueal	XDR	64, 23	ST25
IAL-211	2016	Presidente Prudente	Sec. Traqueal	XDR	64, 23, 72	ST25
IAL-260	2016	Rio Claro	Sec. Traqueal	XDR	116, 23	ST402
IAL-276	2017	Sorocaba	Líquor	XDR	64, 23	ST25
IAL-372	2016	São Paulo	Abscesso	XDR	64, 23	ST25
IAL-545	2016	São Paulo	Sangue	XDR	64, 23	ST1448
IAL-547	2016	Presidente Prudente	Urina	XDR	64, 23, 72	ST25
IAL-600	2016	São Paulo	Cateter	XDR	98	ST49
IAL-763	2016	São Paulo	Sangue	XDR	64, 23	ST25
IAL-768	2016	Aracaju	Líquor	XDR	64, 253	ST25
IAL-872	2016	Campinas	Urina	XDR	64, 23	ST25
IAL-886	2016	São Paulo	Abscesso	XDR	64, 23	ST25
IAL-916	2016	Vitória	Biópsia	XDR	120, 23	ST151

4.1 Detecção das oxacilinases

A PCR-multiplex foi realizada para identificar os grupos de oxacilinases codificados pelos genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24/40-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} e *bla*_{OXA-143-like}.

Todas as cepas eram carreadoras de *bla*_{OXA-51-like}, visto que todas são *A. baumannii*. Foi observada a predominância do gene *bla*_{OXA-23-like} (78%) nos

isolados avaliados, os genes de *bla*_{OXA-24/40-like}, *bla*_{OXA-143-like}, a associação entre os genes *bla*_{OXA-23-like} e *bla*_{OXA-24/40-like} foram detectadas em um (5,5%) isolado cada, e houve uma (5,5%) cepa que carregou exclusivamente *bla*_{OXA-51-like}. Não foram observadas cepas carregando o gene *bla*_{OXA-58-like} (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos genes das oxacilinases encontrados entre os isolados (n=18).

Oxacilinases	N	%
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	1	5,5
<i>bla</i> _{OXA-51-like} + <i>bla</i> _{OXA-23-like}	14	78
<i>bla</i> _{OXA-51-like} + <i>bla</i> _{OXA-24/40-like}	1	5,5
<i>bla</i> _{OXA-51-like} + <i>bla</i> _{OXA-143-like}	1	5,5
<i>bla</i> _{OXA-51-like} + <i>bla</i> _{OXA-23-like} + <i>bla</i> _{OXA-24/40-like}	1	5,5
Total	18	100

4.2 Identificação preditiva dos complexos clonais por m3LST

Os isolados deste estudo foram submetidos ao protocolo de tipagem por 3 loci modificado. Esta metodologia permitiu a identificação preditiva de isolados pertencentes ao complexo clonal CC25 (n=7; 38,9%), considerados clones emergentes de *A. baumannii*. Para os outros onze (61,1%) isolados, o complexo clonal foi inconclusivo por esta metodologia.

4.3 Teste de susceptibilidade por Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Quanto à resistência aos antimicrobianos, em relação aos carbapenêmicos, todos (100%) os isolados apresentaram resistência frente aos fármacos testados. Oito (44,4%) isolados foram resistentes para polimixina B e colistina. Para minociclina, a bula do fabricante alerta que o painel Sensititre não foi validado com número suficiente de cepas resistentes a este fármaco. Todos os oito isolados foram confirmados como resistentes tanto para polimixina B como para colistina.

O único antimicrobiano que não demonstrou resistência contra *A. baumannii* neste estudo foi a minociclina, que apresentou 100% de sensibilidade.

Os valores calculados de CIM₅₀ e CIM₉₀, bem como os percentuais das categorias de suscetibilidade (sensível, intermediário ou resistente) podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 6. Determinação da CIM₅₀ e CIM₉₀ de cada fármaco testado através da microdiluição em caldo e seus respectivos percentuais de suscetibilidade em isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos pertencentes aos clones emergentes estudados (n=18).

Fármacos	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)	S (%)	I (%)	R (%)
Amicacina	>32	>32	5,5	0	94,5
Gentamicina	8	>8	33,3	16,7	50
Tobramicina	1	>8	77,8	5,5	16,7
Doxiciclina	>16	>16	33,3	0	66,7
Minociclina	≤2	4	100	0	0
Ciprofloxacina	>2	>2	0	0	100
Levofloxacina	4	>8	5,5	44,4	50
Sulfametoxazol-Trimetoprim	>4/76	>4/76	5,5	0	94,5
Ampicilina-Sulbactam	16/8	32/16	16,7	38,9	44,4
Imipenem	>8	>8	0	0	100
Meropenem	>8	>8	0	0	100
Doripenem	>4	>4	0	0	100
Colistina	0.5	>4	55,6	0	44,4
Polimixina B	0.25	8	55,6	0	44,4
Cefepime	>16	>16	0	5,5	94,5
Ceftazidima	>16	>16	0	5,5	94,5
Cefotaxima	>32	>32	0	0	100
Piperacilina-Tazobactam	>64/4	>64/4	0	0	100
Ticarcilina-Ácido clavulânico	>128/2	>128/2	0	0	100

Legenda: CIM50 / CIM90: concentração de antimicrobiano capaz de inibir 50 e 90% da população, respectivamente.

Dezessete isolados (94,5%) foram classificados como XDR, enquanto um (5,5%) como MDR. Dentre os oito isolados (44,4%) identificados como resistentes à polimixina B, todos foram classificados como XDR, segundo os critérios estabelecidos por Magiorakos e colaboradores (2012).

4.4 Perfil de Análise Populacional (PAP)

Como pode-se observar na tabela 6, taxa de resistência à polimixina B foi verificada em 44,4% dos isolados. Estes isolados foram submetidos ao teste de determinação do perfil de análise populacional para polimixina B (PAP-PB).

Os resultados do teste PAP-PB são apresentados na figura 7, na qual é possível verificar a curva de crescimento de cada isolado nas diferentes concentrações de polimixina B avaliadas. Para efeitos comparativos, também são apresentados os resultados do PAP para as cepas *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, onde é possível observar que a cepa de *P. aeruginosa* apresenta um desvio da curva à direita (mais resistente) comparada à curva de *E. coli*.

Figura 6. Determinação do método de microdiluição em caldo (BMD) para os oito isolados de *A. baumannii* e para as cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922, onde três experimentos distintos foram realizados em três dias

diferentes e testados com polimixina B. Para maior clareza, o crescimento bacteriano foi expresso em $\log_{10}\text{CFU} / \text{mL}$. Foram utilizadas oito concentrações de polimixina B (0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 e 32 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Cada gráfico refere-se à microdiluição em caldo (MIC) de um isolado diferente e duas cepas ATCC.

Sendo que as cepas estudadas se apresentaram altamente resistentes à polimixina B.

4.5 Tipagem molecular por PFGE

Por meio da técnica de eletroforese em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) obtivemos o dendrograma apresentado na figura 8, com a formação de clones com similaridade igual ou superior a 87% utilizando-se os parâmetros de otimização e tolerância definidos a 1,5%.

Figura 7. Dendrograma gerado a partir do perfil de restrição (Apal) e eletroforese em campo pulsado de cepas de *A. baumannii* representativas dos clones emergentes, determinado por 3-loci sequence typing (m3LST). O dendrograma foi gerado pelo software BioNumerics 7.6.2 utilizando o método unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) e similaridades definidas pelo coeficiente de Dice, com tolerância e otimização definidas a 1,5%, cada.

4.6 MALDI-TOF MS

Todos os isolados avaliados confirmaram a identificação de *A. baumannii*

Figura 9. Dendrograma gerado baseando-se nos picos de MALDI-TOF. Cada cor representa um grupo diferente de cepas de *A. baumannii*.

4.7 Sequenciamento de Genoma Completo (WGS)

Após o sequenciamento do genoma e análise inicial da qualidade do sequenciamento, todas as 18 cepas apresentaram métricas satisfatórias e foram analisadas nas etapas posteriores.

A primeira análise realizada com o genoma montado foi para identificar os alelos codificadores das enzimas oxacilinas. As variantes identificadas da enzima OXA-51-like foram OXA-51 (n=1, 5,6%), OXA-64 (n=13, 72,2%), OXA-98 (n=1, 5,6%), OXA-116 (n=2, 11,1%) e OXA-120 (n=1, 5,6%), onde todas as cepas foram comprovadamente confirmadas como *A. baumannii* (Tabela 7). Com relação à OXA-23-like, OXA-24/40-like e OXA-143-like, foram identificadas as enzimas OXA-23 (n=16, 88,9%), OXA-72 (n=2, 11,1%) e OXA-253 (n=1, 5,6%), respectivamente.

Posteriormente, foram analisadas as sequências-tipo (*sequence type*, ST) do Esquema do Instituto Pasteur. A correlação entre os STs e as oxacilinas identificadas estão demonstradas nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Distribuição dos alelos do gene *blaOXA-51-like* em comparação às sequências tipo (Esquema do Instituto Pasteur) nos 18 isolados de *A. baumannii*.

Alelo	Complexo Clonal / Sequência Tipo (ST)					
	25		49		33	162
	25	1448*	402	49	151	163
<i>blaOXA-51</i>						1
<i>blaOXA-64</i>	12	1				
<i>blaOXA-98</i>				1		
<i>blaOXA-116</i>	1		1			
<i>blaOXA-120</i>					1	
Total	13	1	1	1	1	1

* novo ST

Tabela 8. Distribuição dos alelos dos genes *blaOXA-23-like*, *blaOXA-24/40-like* e *blaOXA-143-like* em comparação às sequências tipo (Esquema do Instituto Pasteur) nos 18 isolados de *A. baumannii*.

Alelos	Complexo Clonal / Sequência Tipo (ST)					
	25		49		33	162
	25	1448*	402	49	151	163
<i>blaOXA-23</i>	13	1	1		1	1
<i>blaOXA-72</i>	2					
<i>blaOXA-253</i>	1					
Total	16	1	1		1	1

* novo ST

Foi identificado um novo alelo do gene *rpIB* (referente ao Esquema do Instituto Pasteur), sua sequência foi submetida ao curador do site pubMLST do Instituto Pasteur e foi, então, depositado o novo alelo *rpIB*-114 (Tabela 9).

Tabela 9. Resultado da tipagem por sequenciamento de multilocus, para os 7 genes constitutivos segundo o protocolo do Instituto Pasteur para o isolado IAL 545 que apresentou novo alelo *rplB*-114.

Isolado	Alelos							ST	CC
	<i>cpn60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltA</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>		
IAL-545	3	3	2	4	7	114*	4	1448**	25

* alelo novo

** ST novo

Na análise por eBURST, é possível confirmar que o ST1448 é SLV (*Single Locus Variant*) e o ST402 é DLV (*Double Locus Variant*) do ST25 e que o ST49, ST151 e ST163 pertencem respectivamente aos complexos clonais CC49, CC33 e CC162 (Figuras 9 e 10).

Figura 10. Análise por eBURST demonstrando as subdivisões de grupos de STs do CC25. Observa-se em vermelho os ST25 e ST402, sendo este último um

DLV. Em rosa encontram-se outros SLV do ST25, como o ST1448. Em amarelo, visualizamos DLV e em azul, TLV.

Figura 11. Análise por eBURST demonstrando as subdivisões de grupos de STs não pertencentes ao CC25. Observa-se em vermelho os ST49, ST151 e ST163.

Entre os diferentes CC e STs, foi possível observar taxas elevadas de resistência aos antimicrobianos avaliados. As taxas de resistência à doxiciclina, por exemplo, foram maiores em isolados pertencentes ao Complexo Clonal CC25, enquanto a taxa de resistência à gentamicina foi mais pronunciada nos outros três complexos clonais (Tabela 10).

Tabela 10. Taxas de resistência aos antimicrobianos entre cepas de *A. baumannii* pertencentes ao complexo clonal CC25 e aos outros CC (n=18).

Antimicrobiano	Complexo Clonal			
	CC25	CC49	CC33	CC162
	(n=15; 83.3%)	(n=1; 5.56%)	(n=1; 5.56%)	(n=1; 5.56%)
	n (%)	n (%)		
AK	14 (93.3)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
SAM	13 (86.7)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
FEP	15 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
CTX	15 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
CAZ	15 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
CIP	15 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
COL	6 (33.3)	1 (100)	1 (100)	0 (0)
DOR	15 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
DOX	12 (80)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GEN	9 (60)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
IMI	15 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
LEV	14 (93.3)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
MEM	15 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
MIN	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

TZP	15 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
POL	6 (33.3)	1 (100)	1 (100)	0 (0)
SXT	15 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)
TIM	15 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
TOB	3 (20)	0 (0)	1 (100)	0 (0)

Legenda: AK: amicacina; SAM: ampicilina–sulbactam; FEP: cefepime; CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; COL: colistina; DOR: doripenem; DOX: doxiciclina; GEN: gentamicina; IMP: imipenem; LEV: levofloxacina; MEM: meropenem; MIN: minociclina; TZP: piperacilina-tazobactam; POL: polimixina B; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; TIM: ticarcilina–ácido clavulânico; TOB: tobramicina.

Pode-se observar que 100% das amostras XDR são isolados pertencentes ao CC25, entretanto, a amostra pertencente ao CC162 se apresentou como MDR (Tabela 11).

Tabela 11. Distribuição dos fenótipos de resistência de *A. baumannii* de acordo com o CC25 e outros CC (n=18).

Categoria de resistência (Magiorakos)	Complexo Clonal			
	CC25 (n=15; 83.3%)	CC49 (n=1; 5.56%)	CC33 (n=1; 5.56%)	CC162 (n=1; 5.56%)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
MDR	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
XDR	15 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)
PDR	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Legenda: MDR: multirresistente (resistente a ≥ 1 agente em ≥ 3 categorias de antimicrobianos); XDR: extensivamente resistente (resistente a ≥ 1 agente em todas menos ≤ 2 categorias de antimicrobianos); PDR: pan-droga resistente (resistente a todos os agentes listados).

Apesar de possuímos um N pequeno, realizamos uma análise comparativa entre as taxas de resistência e a presença de genes de resistência entre os isolados sequenciados e pudemos verificar padrões associados aos Complexos Clonais. Por exemplo, há uma taxa maior de genes de resistência e bombas de efluxo em isolados do CC25, enquanto esses genes foram menos pronunciados nos isolados pertencentes aos outros CC (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12. Distribuição dos genes de resistência antimicrobiana em cepas de *A. baumannii* pertencentes ao complexo clonal CC25 e aos outros CC (n=18).

Gene de resistência antimicrobiana	Complexo Clonal			
	CC25 (n=15; 83.3%)	CC49 (n=1; 5.56%)	CC33 (n=1; 5.56%)	CC162 (n=1; 5.56%)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>blaADC-25</i>	15 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>blaOXA-23</i>	14 (93.3)	0 (0)	1 (100)	1 (100)

<i>blaOXA-64</i>	13 (86.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>blaOXA-72</i>	2 (13.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>blaOXA-98</i>	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>blaOXA-116</i>	2 (13.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>blaOXA-253</i>	1 (6.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>blaTEM-1B</i>	2 (13.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>blaTEM-104</i>	1 (6.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>blaTEM-198</i>	1 (6.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>blaTEM-207</i>	1 (6.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>blaTEM-234</i>	1 (6.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>aph(3')-Via</i>	8 (53.3)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
<i>aph(3')-Ib</i>	14 (93.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>aph(6)-Ib</i>	14 (93.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>aac(3)-IIa</i>	3 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>aac(6')-Ia</i>	2 (13.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>ant(2'')-Ia</i>	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
<i>sul2</i>	14 (93.3)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
<i>tetB</i>	14 (93.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>floR</i>	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)

Tabela 13. Distribuição dos sistemas de efluxo encontradas em cepas de *A. baumannii* pertencentes ao complexo clonal CC25 e aos outros CC (n=18).

Sistema de efluxo	Complexo Clonal			
	CC25	CC49	CC33	CC162
	(n=15; 83.3%)	(n=1; 5.56%)	(n=1; 5.56%)	(n=1; 5.56%)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>adeF</i>	14 (93.3)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>adeI</i>	0 (0)	1 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>adeJ</i>	12 (80)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>adeK</i>	14 (93.3)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>adeL</i>	14 (93.3)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>adeN</i>	11 (73.3)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>adeR</i>	12 (80)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>abaF</i>	9 (60)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>abaQ</i>	14 (93.3)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>abeM</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>abeS</i>	15 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>amvA</i>	12 (80)	1 (100)	0 (0)	1 (100)

A resistência a polimixina está associada à mutações no gene *pmrB* nas posições T13A, M145I e N256Y. Além disso, o aminoácido I187P foi descrito pela primeira vez em uma nova posição (Tabela 14).

Tabela 14. Mutações em proteínas constitutivas associadas com fenótipos de resistência a polimixina B em *A. baumannii*.

		A262P	Poirel et al., 2017
		R263C	Poirel et al., 2017
		R263L	Poirel et al., 2017
		R263P	Poirel et al., 2017
		Q277H	Poirel et al., 2017
		Q270P	Sun et al., 2020
		G315D	Poirel et al., 2017
	HATPase_c (326–437)	N353Y	Poirel et al., 2017
		P377L	Poirel et al., 2017
		F387Y	Poirel et al., 2017
		S403F	Poirel et al., 2017
PmrC		R125P	Gerson et al., 2019
		I131V	Lunha et al, 2020
		H499R	Lunha et al, 2020
LpxA (262)		Fr at I25	Poirel et al., 2017
		G68D	Poirel et al., 2017
		Q72K	Poirel et al., 2017
		Fr at H121	Poirel et al., 2017
		Fr at D130	Poirel et al., 2017
		H159D	Poirel et al., 2017
		Q234*	Poirel et al., 2017
LpxC (276)		P30L	Poirel et al., 2017
		C120R	Lunha et al, 2020
		N287D	Lunha et al, 2020
		Fr at D45	Poirel et al., 2017
		Fr at T285	Poirel et al., 2017
LpxD (356)		Fr at K317	Poirel et al., 2017
		V63I	Lunha et al, 2020
		K117E	Lunha et al, 2020

5. DISCUSSÃO

Mesmo não sendo tão frequentes, os clones considerados emergentes apresentam taxas de resistência comparáveis aos clones de alto risco endêmicos, ou até mais, como é o caso da polimixina B (Camargo et al., 2020). Com o decorrer dos anos, a diversidade de STs se mostrou ser vantajosa diante de uma pressão seletiva, visto que não é o mais forte que sobrevive, mas o mais adaptativo e isso significa que os atuais clones emergentes podem ser os clones endêmicos do futuro se houver uma pressão de seleção, que sabemos, no caso das bactérias, ser majoritariamente guiado por uso de antimicrobianos.

Os genes das oxacilinases são distribuídos de diferentes formas ao redor do mundo e possuem o gene *bla*_{OXA-23-like} amplamente distribuído em diversos países (Evans e Amyes, 2014). Neste estudo, identificamos alta prevalência de *bla*_{OXA-23} em cepas XDR e na única cepa MDR isoladas de pacientes de diferentes instituições brasileiras, reforçando os dados previamente observados no nosso país (Medeiros e Lincopan, 2013; da Silva et al., 2018; Polotto et al., 2019). Em adição, os genes *bla*_{OXA-72} e *bla*_{OXA-253} também foram identificados, porém com menor frequência (n=2; 11,1% e n=1; 5,6%, respectivamente), corroborando com estudos anteriores que detectaram esses genes no Brasil (Zander et al., 2014; Vasconcelos et al., 2015; Cavalcanti et al., 2016; Camargo et al., 2016; Levy-Blitchtein et al., 2018).

Em nosso estudo foi observada a correlação entre *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-72} em duas cepas distintas de *A. baumannii* ST25. O estudo de Boettger e colaboradores (2020) reportou pela primeira vez no mundo essa correlação, porém em cepas pertencentes ao ST1; outros três estudos, observaram essa mesma co-ocorrência, dois em cepas do ST2 em Sófia, capital da Bulgária (Pfeifer et al., 2017) e em Setif, na Argélia (Hadjadj, Bakour e Rolain, 2018) e o outro em IC II em Beirute, no Líbano (Dahdouh et al., 2016). Não há estudos que falem sobre a presença simultânea de *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-72} em cepas pertencentes ao ST25.

Além disso, detectamos, um alto número de variantes de *bla*_{OXA-51-like}, como OXA-51 (n=1; 5,6%), OXA-64 (n=13; 72,2%), OXA-98 (n=1; 5,6%), OXA-116 (n=2; 11,1%) e OXA-120 (n=1; 5,6%). A prevalência da OXA-64 no nosso estudo já era esperado e reforça os resultados observados por Camargo e

colaboradores (2016), Rodríguez e colaboradores (2016) e por Kurihara e colaboradores (2020).

A minociclina se apresentou ativa contra todos os isolados, sendo usualmente eficaz contra cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (Lashinsky et al., 2017; Poirel et al., 2017), porém a resistência a este fármaco já está sendo observada (Cheah et al., 2016; Pournaras et al., 2017; Vasconcellos et al., 2017a), embora esta tetraciclina não esteja disponível no Brasil na formulação EV (Schuertz et al., 2018). Em contrapartida, as taxas de resistência à outras classes antimicrobianas foram altas. Aminoglicosídeos, por exemplo, apresentaram taxas de resistência variando de 93,3% para amicacina à 20% para tobramicina no nosso estudo, diferentemente do que foi observado em outros estudos, onde havia atividade conservada contra *A. baumannii* (Maragakis e Perl, 2008; Buenahora et al., 2016).

Entre os genes de resistência antimicrobiana relacionados aos aminoglicosídeos detectados, os mais frequentes foram *aph(3')-Ib* e *aph(6)-Ib*, ambos presentes em 93,3% dos isolados, seguidos de *aph(3')-Via* (53,3%), *aac(3)-IIa* (20%) e *aac(6')-Ia* (13,7%), conferindo resistência à gentamicina e amicacina (Viehman et al., 2015).

Em relação aos genes de resistência do grupo das tetraciclinas, o *tetB* (93,3%) foi o único detectado, porém a resistência desse grupo também é mediada através de bombas de efluxo do tipo Ade (*adeF*, *adeI*, *adeJ*, *adeK*, *adeL*, *adeN* e *adeR*), gerando resistência à tigeciclina (Coyne et al., 2011; Viehman et al., 2015).

Quando trata-se de resistência à polimixina B, esta ainda é incomum entre bactérias não fermentadoras (excessão de algumas intrinsecamente resistentes), especialmente em clones emergentes de *A. baumannii*, mas há relatos ocasionais de resistência a essa droga, como a relatada na Coreia (18,1%) (Ko et al., 2007), Europa (2,7%) e América do Norte e América Latina (1,7%) (Gales et al., 2006), porém não há informações sobre o complexo clonal. No nosso estudo, além da resistência observada à polimixina, os isolados também eram resistentes aos carbapenêmicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, inibidores de síntese de folato e aos inibidores de beta-lactamases.

Para tentar entender como a resistência à polimixina B se comporta, realizamos o teste PAP (perfil de análise populacional), que foi considerado o teste padrão ouro para hVISA (heterorresistência de *S. aureus* contra vancomicina) (Wootton et al., 2001), portanto, utilizamos este teste para avaliar populações bacterianas viáveis de *A. baumannii* em relação às concentrações seriadas de polimixina B.

Houve uma parte dos isolados com apresentação constante de resistência a níveis elevados de polimixina B. Por outro lado, alguns isolados apresentaram perfil indicativo de hetero-resistência, pois são suscetíveis a uma concentração menor, mas apresentam crescimento significativo quando expostos a uma concentração maior do antimicrobiano. Embora não haja evidências muito definitivas sobre esse fenômeno, estudos futuros, principalmente clínicos com avaliação do desfecho, podem ajudar a elucidar o impacto desse fenótipo de resistência na evolução das infecções. Devido a esta falta de padronização para os testes de PAP para *Acinetobacter* spp, realizamos o teste com duas cepas ATCC recomendadas para a validação de testes de sensibilidade à polimixina B, a saber, *E. coli* 25922 e *P. aeruginosa* 27853. Essas cepas apresentaram uma curva de não heterorresistência (não houve subpopulações crescendo nas concentrações mais altas). Da mesma forma, o fato de a área sob a curva da cepa ATCC *P. aeruginosa* 27853 ser maior do que a da cepa ATCC *E. coli* 25922 indica, com todas as limitações que podemos reconhecer, reprodutibilidade e confiabilidade do teste. Isso ocorre porque a cepa ATCC *P. aeruginosa* 27853 tem uma faixa MIC inferior para polimixina B aceitável (0,5-2,0 g / mL) ligeiramente maior do que a cepa ATCC *E. coli* 25922 (0,25-2,0 g / mL).

Devido a polimixina E (colistina) ser mais utilizada que a polimixina B no mundo, não foram encontrados estudos sobre a relação de heterorresistência observada entre *A. baumannii* e polimixina B. Porém, de acordo com estudos (Li et al., 2006; Hawley et al., 2008; Karakonstantis e Saridakis, 2020) sobre colistina, os resultados obtidos corroboram com o que foi observado neste estudo.

Embora os mecanismos de resistência à polimixina não tenham sido totalmente esclarecidos até o momento em *Acinetobacter*, podemos atribuir o fenótipo observado a mutações não silenciosas no sistema de dois componentes

PmrA-PmrB. Todas as cepas com resistência a polimixina apresentaram mutações no gene *pmrB*, que parece ser o gene mais comumente mutado em *A. baumannii* resistente à polimixina (Gerson, et al 2019).

Neste estudo, foram descritas novas substituições de aminoácidos nas posições reconhecidas T13A, T145I e N256Y, e uma nova posição de substituição de aminoácidos foi identificada, T187P. Outra nova mutação, N440H, também foi identificada, mas estava distribuída entre cepas resistentes e suscetíveis; portanto, não podemos atribuir o fenótipo de resistência à polimixina a essa mutação.

A presença de uma grande parte de isolados do CC25 com resistência à polimixina indica uma relação que merece ser monitorada, uma vez que este fármaco é muitas vezes empiricamente empregado no caso de infecções graves.

Apesar de os isolados pertencentes aos CC1, CC15 e CC79 serem os mais frequentes no território nacional, o CC25 e outros diferentes clones pertencentes a diferentes STs vem sendo consistentemente identificados no Brasil (Medeiros e Lincopan, 2013; Vasconcellos et al., 2017; da Silva et al., 2018). Com isso, esses clones também devem ser monitorados, pois podem se tornar emergentes em situações de pressão seletiva.

Com o sequenciamento do genoma completo houve um avanço no estudo da resistência aos antibióticos, assim como a identificação de espécies bacterianas, tipagem e dados sobre complexos clonais.

Um aspecto muito relevante da constante evolução dos clones de *A. baumannii* circulantes nos hospitais amostrados é o fato de termos identificado um novo alelo para o gene *rplB*, que foi depositado na base de dados wgMLST. Após depósito deste novo alelo, novo ST nunca previamente reportado no mundo foi depositado em repositório público.

Os resultados deste estudo fornecem dados sobre o aumento das taxas de resistência em *A. baumannii*, que anteriormente eram tratados com betalactâmicos e/ou outros fármacos. Pudemos observar, também, um aumento na circulação de clones antes pouco relatados em nosso meio. Tomados juntos e acrescido de que apenas a minociclina se apresentou com alta atividade contra os isolados, torna-se necessário a realização de um controle epidemiológico mais rígido para que haja a diminuição da incidência

deste patógeno em nosso meio e a criação de novos alvos terapêuticos, visto que a polimixina, considerada última opção para tratamento, têm se mostrado resistente em uma grande amostragem de nosso estudo, tornando-se mais uma preocupação.

6. CONCLUSÕES

- Entre os 18 clones emergentes estudados, observamos o predomínio do CC25, sendo as outras três cepas pertencentes aos CC49, CC33 e CC162.
- Oito isolados foram resistentes para polimixina e colistina, e categorizados como XDR segundo critérios de Magiorakos e colaboradores (2012);
- Apenas a minociclina manteve-se sensível para todas as cepas de *A. baumannii* no nosso estudo, o que demonstra uma situação preocupante, visto que a terapia afeta diretamente as infecções causadas por essa bactéria;
- Com base nos picos gerados por MALDI-TOF-MS, todos os isolados avaliados confirmaram a identificação de *A. baumannii*, no entanto, não houve correlação com seus complexos clonais;
- Detectou-se, principalmente, os genes *bla*_{OXA-64} em nosso estudo, visto que há uma correlação entre CC25 e essa oxacilinase;
- Dois isolados foram carreadores de *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-72} simultaneamente;
- Foi identificado um novo alelo para o gene *rp*_B e sua sequência foi submetida ao curador do site pubMLST do Instituto Pasteur;
- Na análise por eBURST, é possível confirmar que os ST1448 e ST402, observados nesse estudo, são respectivamente SLV e DLV do ST25 e que os ST49, ST151 e ST163 pertencem aos CC49, CC33 e CC162, respectivamente;
- A resistência a polimixina no nosso estudo possivelmente está associada à mutações no gene *pmrB* nas posições T13A, M145I e N256Y. Além disso, o aminoácido I187P foi descrito pela primeira vez em uma nova posição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 2014; 53(10): 1565–1574.

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

Angeletti, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *Journal of Microbiological Methods* 2017; 138:20-29.

Antonio CS, Neves PR, Medeiros M, Mamizuka EM, Elmor de Araújo MR e Lincopan N. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *bla*_{OXA-143} gene in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 1322-23.

ANVISA

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/lactamicos2.htm

Arnold TM, Forrest GN, Messmer KJ. Polymyxin antibiotics for gramnegative infections. *Am J HealthSyst Pharm* 2007; 64(8):819-26.

Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L, Hankins JV, Trent MS, Hancock RE. The pmrCAB Operon Mediates Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and Clinical Isolates through Phosphoethanolamine Modification of Lipid 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.

Azevedo SMM. Farmacologia dos antibióticos beta-lactâmicos. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2014.

Bacterio.Net – <http://bacterio.net>, acesso em 21/05/2019.

Baptista MGFM. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Saúde. Lisboa, 2013, pp 01-28.

Barbosa ACN. Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Acinetobacter spp.* Produtores de oxa-carbapenemases provenientes de diferentes reservatórios. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Infectologia da Universidade Federal de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. 2019.

Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MAD, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2005; 43:4382-90.

Beijerinck MW. Über pigmentbildung bei essigbakterien. Centr Bakteriöl Parasitenk Abt 1911; 167-76.

Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(6):1953-58.

Bernards AT, Harinck HJ, Dijkshoorn L, Van Der Reijden TJ, Van Den Broek PJ. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. Infect Control Hosp Epidemio 2004; 25(11):1002-1004.

Boettger BC, Cayô R, Streling AP, Nodari CS, Almeida LGP, Martins WMBS, Pignatari ACC. Dynamic of High-Risk *Acinetobacter baumannii* Major Clones in a Brazilian Tertiary Hospital During a Short Time Period. Microbial Drug Resistance. 2020.

Bonomo RA e Szado D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2006; 43 Suppl 2:S49-56

Bouvet P, Grimont P. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., and *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter jhonsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Evol Microbiol 1986; 36:228-240.

Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. Ann Inst Pasteur Microbiol 1987; 138(5): 569-78.

Brasil. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (2013 – 2015). Brasília, 2015.

Brasil. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde/Rede RM. Ano IV Edição nº 8 de Dezembro de 2014a.

Brasil. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde/Rede RM. Ano V Edição nº 9 de Dezembro de 2014b.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Critérios Diagnósticos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2017.

Brasil. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Boletim Informativo da Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº20: Avaliação dos indicadores nacionais das IRAS e resistências microbianas do ano de 2018.

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

Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. Clin Microbiol Rev. 2020; 33:e00047-19.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 2010; 39(6):1211-33.

Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. Antimicrob Agents Chemother 1989a; 33(3):264-70.

Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. Antimicrob Agents Chemother 1989b; 33(3): 271-76.

Camargo CH, Tiba MR, Saes MR, Vasconcellos FM, Santos LF, Romero EC, Garcia DO. Population structure analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Brazil reveals predominance of clonal complexes 1, 15, and 79. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology 2016; 60(4):2545-47.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods 2005; 63(3):219-28.

Carvalho KR, Carvalho-Assef APD, Peirano G, Santos LCG, Pereira MJF, Asensi MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes

carrying *bla*OXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34(1): 25-28.

Castelli MA, Vescovi EG, Soncini FC. The Phosphatase Activity Is the Target for Mg21 Regulation of the Sensor Protein PhoQ in *Salmonella*. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(30):22948–54.

Center for Diseases Control and Prevention – CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services. 2013.

Cerezales M, Xanthopoulou K, Wille J, Bustamante Z, Seifert H, Gallego L, Higgins PG. *Acinetobacter baumannii* analysis by core genome multi-locus sequence typing in two hospitals in Bolivia: endemicity of international clone 7 isolates (CC25). 2019; 53(6): 844-9.

Chagas TPG. Caracterização de *Acinetobacter spp.* multirresistentes produtores de carbapenemases, dos tipos OXA e NDM, isolados de diferentes regiões do Brasil. Dissertação apresentada ao Programad e Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz para obtenção do título de doutor em ciências. 2015.

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). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease - Journal*. 2014; 468-72.

Chagas TP, Seki LM, Cury JC, Oliveira JA, Dávila AM, Silva DM, Asens MD. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol* 2011; 111(3):572-81.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Seven Informational Supplement. Wayne, PA: CLSI; 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Eight Informational Supplement. Wayne, PA: CLSI; 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 30th ed. M100. Wayne, PA: CLSI; 2020.

Costa FR. Caracterização da presença de ISAba1 a montante do gene oprD-like em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenems. Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Mestre em Ciências. 2015.

Coyne S, Courvalin P, Perichon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(3):947-953.

Dahdouh E, Hajjar M, Suarez M, Daoud Z. *Acinetobacter baumannii* Isolated from Lebanese Patients: Phenotypes and Genotypes of Resistance, Clonality, and Determinants of Pathogenicity. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2016, 6:163.

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

Davis KA, Moran KA, McAllister CK, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. Emerg Infect Dis. 2005; 11(8):1218-24.

De Azevedo FKSF, Dutra V, Nakazato L, Mello CM, Pepato MA, de Sousa ATHI, Takahara DT, Hahn RC, Souto FJD. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in two hospitals in Central Brazil: the

role of ST730 and ST162 in clinical outcomes. *Journal of Medical Microbiology* 2018; 68(1).

De Azevedo FKSF, Dutra V, Nakazato L, Pepato MA, Sousa ATHI, de Azevedo CCSF, Souto FJD. New sequence types of *Acinetobacter baumannii* in two emergency hospitals in the Central-West region of Brazil. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* 2019; 52: e20190077.

Den Dunnen JT, Van Ommen GJB. Methods for Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *The Annals of Applied Biotechnology* 1992; 38: 161-177.

de Sá Cavalcanti FL, Almeida AC, Vilela MA, de Moraes MA, de Moraes 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; 77:250-51.

de Sá Cavalcanti FL, Mendes-Marques CL, Vasconcelos CR dos S, de Lima Campos T, Rezende AM, Xavier DE, Leal NC, de-Melo-Neto OP, de Moraes MM, Leal-Balbino TC. High frequency of OXA-253-producing *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 61:e01309-16.

De Sa Cavalcanti FL, et al. Emergence of extensively drug-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Recife, Brazil: risk of clonal dissemination? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 77:250–51.

Dezoti C, Watanabe M, Pinto CF, Neiva LB, Vattimo MF. Functional protection of heme-oxygenase-1 enzyme in ischemic and toxic acute kidney injury. *Acta Paul Enferm.* 2009; 22:490-93.

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

Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals multidrugresistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 2007; 5(12):939-51.

Dijkshoorn L, Van Harsselaar B, Tjernberg I, Bouvet PJ, Vaneechoutte M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. Syst Appl Microbiol 1998; 21(1):33-39.

Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. Biomed Res Int 2014.

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

Dzidic S, Suskovic J, Kos B. Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. Food Technology Biotechnology 2007; 46(11): 11-21.

Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, Canton R, Doumith M, Giske C, Grundman H, Hasman H, Holden MTG, Hopkins KL, Iredell J, Kahlmeter G, Köser CU, MacGowan A, Mevius D, Mulvey M, Naas T, Peto T, Rolain JM, Samuelsen Ø, Woodford N. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. Clin Microbiol Infect. 2017; 23(1):2-22.

Enoch DA, Summers C, Brown NM, Moore L, Gillham MI, Burnstein RM, Thaxter R, Enoch LM, Matta B, Sule O. Investigation and management of an outbreak of multidrug-carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Cambridge, UK. 2008; 70(2):109-118.

EUCAST: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As

recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group, 2016.

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf

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

Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad, R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: challenges, issues, and recommendations. Journal of Clinical Microbiology. 2018.

Figueiredo DQ, Santos KR, Pereira EM, Schuenck RP, Mendonça-Souza CR, Teixeira LM, Mondino SS. First report of the bla_{OXA-58} gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106:368-70.

Fitzgerald C, Helsel LO, Nicholson MA, Olsen SJ, Swerdlow DL, Flahart R, Sexton J, Fields PI. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter* Barros, MPS. Padronização e Avaliação da técnica de eletroforese... 76 jejuni during an outbreak involving a food handler. Journal of Clinical Microbiology 2001, 39: 2386-2390.

Fitzpatrick MA, Ozer EA, Hauser AR. Utility of Whole-Genome Sequencing in Characterizing *Acinetobacter* Epidemiology and Analyzing Hospital Outbreaks. J Clin Microbiol. 2016; 54(3):593-612.

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, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-2009). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:2070-74.

Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12(4):315-21.

Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 1991; 29(2):277–82.

Gerson S, Lucaßen K, Wille J, Nodari CS, Stefanik D, Nowak J, Wille T, Betts JW, Roca I, Vila J, Cisneros JM, Seifert H, Higgins PG. Diversity of amino acid substitutions in PmrCAB associated with colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2019.

Girardello R. Avaliação dos mecanismos de resistência à polimixina B em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*. Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de doutor em ciências. 2012.

Gionco B, Pelayo JS, Venancio EJ, Cayô R, Gales AC, Carrara-Marroni FE. Detection of OXA-231, a new variant of bla_{OXA-143} in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:2531-32.

Girlich D, Damaceno QS, Oliveira AC, Nordmann P. OXA-253, a variant of the carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:2976-78.

Gomes DBC, Genteluci GL, Carvalho KR, Medeiros LC, Almeida VC, De Castro EAR, Villas Boas MHS. *Acinetobacter baumannii* multirresistentes: emergência

de resistência à polimixina no Rio de Janeiro. *Vigilância Sanitária em Debate*, Rio de Janeiro 2018; 4(3):28-34.

Gottesman BS, Carmeli Y, Shitrit P, Chowers M. Impact of quinolone restriction on resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from urine by culture in a community setting. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago 2009; 49:869-75.

Groisman EA, Kayser J, Soncini FC. Regulation of Polymyxin Resistance and Adaptation to Low-Mg²⁺ Environments. *J Bacteriol.* 1997; 179(22):7040-45.

Gulen TA, Guner R, Celikbilek N, Keske S, Tasyaran M. Clinical importance and cost of bacteremia caused by nosocomial multi drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Infect Dis.* 2015; 38:32-35.

Hadjadj L, Bakour S, Rolain J-M. Co-occurrence of carbapenemase encoding genes in *Acinetobacter baumannii*, a dream or reality? *BMC Microbiology.* 2018; 18:107.

Hamidian M, Nigro SJ. Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Genomics*; 2019.

Hamidian M, Nigro SJ, Hall RM. Problems with the Oxford Multilocus Sequence Typing scheme for *Acinetobacter baumannii*: do sequence type 92 (ST92) and ST109 exist? *J Clin Microbiol* 2017; 55:2287-89.

Hermesen ED, Sullivan CJ, Rotschafer JC. Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications. *Infect Dis Clin North Am.* 2003; 17(3):545-62.

Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread o carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(2):233-38.

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; 53:5035-38.

Higgins PG, Prior K, Harmsen D, Seifert H. Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Acinetobacter baumannii*. 2017.

Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D et al. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 821–3.

Hijazin M, Hassan AA, Alber J, Lammler C, Timke M, Kostrzewa M, Prenger-Berninghoff E, Zschock M. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for species identification of bacteria of genera *Arcanobacterium* and *Trueperella*. *Veterinary Microbiology* 2012; 157(1-2): 243-245.

Holt K, Kenyon JJ, Hamidian M, Schultz MB, Pickard DJ, Dougan G, Hall R. Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1. *Microb Genom.* 2016; 23;2(2):e000052.

Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 6(9):a025320.

Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for especific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control.* 2008; 36:309-32.

Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates *J Clin Microbiol* 1998; 36(7):1938-41.

Juni E. Genetics and physiology of *Acinetobacter*. Ann Rev Microbiol 1978; 32:349-71.

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

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

Kempf M, Rolain JM. Emergência de resistência a carbapenems em *Acinetobacter baumannii* na Europa: impacto clínico e opções terapêuticas. International Journal of Antimicrobial Agents 2012; 3: 105-14

Kiffer C, et al. MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. Braz J Infect Dis 2005a; 9(3):216-24.

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

Ko KS, Suh JY, Kwon KT, et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. J Antimicrob Chemother. 2007; 60(5):1163-7.

Konemann EW, Winn WC, Allen SD, Janda WN, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman's Color Atlas and TextBook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA. 2006. 1535p.

Kurihara MNL, Sales RO, Silva KS, Maciel WG, Simionatto S. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks: a global problem in healthcare settings. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*. 2020; 53:e20200248

Kwa AL, LimTP, Low JG, Hou J, Kurup A, Prince RA, Tam VH. Pharmacokinetics of polymyxin B1 in patients with multidrug resistant Gram-negative bacterial infections. *Diagn Microbial Infect Dis*. 2008; 60(2):163-7.

Leão ACQ, Menezes PR, Oliveira MS, Levin AS. *Acinetobacter* spp. are associated with a higher mortality in intensive care patients with bacteremia: a survival analysis. *BMC Infect Dis* 2016; 16:386.

Lee HY, Chang RC, Su LH, et al. Wide spread of Tn2006 in an AbaR4-type resistance island among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40:163-167.

Lessel EF. International committee on nomenclature of bacteria subcommittee on the taxonomy of *Moraxella* and allied bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 1971; 21:213-14.

Levy-Blitchtein S, Roca I, Plasencia-Rebata S, Vicente-Taboada W, Velásquez-Pomar J, Muñoz L, Moreno-Morales J, Pons MJ, del Valle-Mendoza J and Vila J. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7:119.

Lewis T, Loman NJ, Bingle L, Jumaa P, Weinstock GM, Mortiboy D, Pallen MJ. High-throughput whole-genome sequencing to dissect the epidemiology of *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital outbreak. *J Hosp Infect*. 2010; 75(1):37-41.

Li H, Liu F, Zhang Y, Wang X, Zhao C, Chen H, Zhang F, Zhu B, Hu Y, Wang H. 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, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections (Review). *Lancet Infect Dis*. 2006a; 6(9):589-601.

Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004; 62(2): 159-204.

Livermore DM. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clinical Infec Dis* 2002; 34(5):634-640.

Lunha K, Thet KT, Ngudsuntia A, Charoensri N, Lulitanond A, Tavichakorntrakool R, Wonglakorn L, Faksri K, Chanawong A. PmrB mutations including a novel 10-amino acid repeat sequence insertion associated with low-level colistin resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infection, Genetics and Evolution* 2020; 104577.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: na international expert proposal for interim standart definitions for acquired resistente. *Clin Microbiol Infec* 2012; 18:268-81.

Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3375-80.

Mahalingam S, Cheong YM, Kan S, Yassin RM, Vadivelu J, Pang T. Molecular epidemiologic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal Clinical Microbiology* 1994; 32: 2975-2979.

Manikal Vm, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect Dis* 2000; 31(1):101-06.

Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance and treatment options. *Clin Infect Dis* 2008; 46(8):1254-63.

Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwartz D, Tarabeia J, Fefer I, Schwaber MJ, et al. Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2007b; 45:1551e5.

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

Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira Ca, Carneiro I, Reis M, De Souza MA, Tranchesi R, Barata CU, Edmond MB; Brazilian Scope Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* 2011; 49(5):1866-71.

Martí S, Fernández-Cuenca F, Pascual A et al. Prevalence of the tetA and tetB genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 77–80.

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

Martins N, Dalla-Costa L, Uehara AA, Riley LW, Moreira BM. Emergence of *Acinetobacter baumannii* international clone II in Brazil: reflection of a global expansion. Infect Genet Evol. 2013.

Martins N, Picão RC, Cerqueira-Alves M, Uehara A, Barbosa LC, Riley LW, Moreira BM. A new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clones. Infect Genet Evol. 2016; 42:41-5.

Medeiros M, Lincopan N. Oxacillinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. J Bras Patol Med Lab 2013; 49(6):391-405.

Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. J Antimicrob Chemother 2009; 63:55-59.

Meumann EM, Anstey NM, Currie BJ, Piera KA, Kenyon JJ, Hall RM, Davis JS, Sarovich DS. Genomic epidemiology of severe community-onset *Acinetobacter baumannii* infection. Microb Genom. 2019; 5(3): e000258.

Miller AK, Brannon MK, Stevens L et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. Antimicrob. Agents Chemother. 2011; 55(12):5761-69.

Moffat JH, Harper M, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Insertion sequence ISAb11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(6): 3022-4.

Moreira LB. Princípios para o uso racional de antimicrobianos. Revista da AMRIGS 2004; 2:73-152.

Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, Selgrade SE, Miller SI, Denton M, Conway SP, Johansen HK, Høiby N. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(2):1019-30.

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; 39:396-401.

Mota FS, Oliveira HA, Souto RCF. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. RBAC 2018; 50(3): 270-7

Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. Emerg Infect Dis 2010; 16(1):35–40.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC. Manual of Clinical Microbiology. 9 ed. Washington: ASM Press; 2007.

Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Van Der Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, Vaneechoutte M, Brisse S, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol 2011; 162(4):393-404.

Nigro SJ e Hall RM. Distribution of the bla_{OXA-23} containing transposons Tn2006 and Tn2008 in Australian carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. J Antimicrob Chemother 2015; 70:2409-11.

Nigro SJ e Hall RM. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the OXA-23 carbapenemase gene. J Antimicrob Chemother 2016; 71:1135-47.

Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. Clinical Infectious Diseases 2019; 69(7):S521–S528.

Nutman A, Lerner A, Schwartz D, Carmeli Y. Evaluation of carriage and environmental contamination by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2016; 22:949e5-949e7.

Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdmann EA. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. Braz J Cardiovasc Surg. 2006; 21(4): 444-452.

Padoveze MC, Juskevicius LF, Santos TR, Nichiata LI, Ciosak SI, Bertolozzi MR. The concept of vulnerability applied to Healthcare-associated Infections. Rev Bras Enferm [Internet]. 2019;72(1):299-303.

Pagano M, Martins AF e Barth AL. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Braz J Microbiol 2016; 47:785-92.

Pagano M, Rocha L, Sampaio JL, Martins AF, Barth AL. Emergence of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* belonging to high-risk clones (CC15 and CC79) in different brazilian states. Infect Control Hosp Epidemiol 2017; 38:252-54.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. Clinical Microbiology Reviews. 2008; 21:538-82.

Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(10):3471-84.

Pfeifer Y, Trifonova A, Pietsch M, Brunner M, Todorova I, Gergova I, Savov E. Clonal Transmission of Gram-Negative Bacteria with Carbapenemases NDM-1, VIM-1, and OXA-23/72 in a Bulgarian Hospital. *Microbial Drug Resistance*. 2017; 23(3):301–307.

Pfeifer Y, Wilham G, Zander E, Wichelhaus TA, Gotting S, Hunfeld K-P, Seifert H, Witte W, Higgins PG. Molecular characterization of bla_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1998-2001.

Pillonetto M, Arend A, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TPG, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. First Report of NDM-1-Producing *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(12): 7592–94.

Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *IUBMB Life* 2011; 63(12): 1061-7.

Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1252-56.

Poirel L, Jayol A, & Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017; 30(2):557–96.

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

Polotto M, Casella T, Tolentino FM, Mataruco MM, Porto NKM, Binhardi MFB, Nogueira MCL. Investigation of carbapenemases and aminoglycoside modifying enzymes of *Acinetobacter baumannii* isolates recovered from patients admitted to intensive care units in a tertiary-care hospital in Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 2019; 53:e20190044.

Prado A, Arias NL, Chávez M, Cabrera CE, Gómez RF. Phenotypic characterization of *Acinetobacter baumannii* isolates in a high-complex healthcare institution in the city of Cali. Biomedica Suppl 2014; 1:101-107.

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

Rocha L, Pagano M, Campos JC, Sampaio JLM, Martins AF, Barth AL. *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos no Brasil: perfil de suscetibilidade e diversidade de oxacilinasases. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 2017; 53(6).

Rodríguez CH, Balderrama YN, Nastro M, Nuñez QT, Castro CG, Magne VR, Cuba TU, Valenzuela N, Roach F, Mota MI, Burger N, Aguayo GV, Bruni G, Pandolfo C, Bastyas N, Famiglietti A. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in South America. J Med Microbiol 2016; 65:1088–91.

Rodríguez CH, Flores SA, Rodríguez M, Spinozzi M, Bruni G, López AL, David V, Aiassa MS, Marqués IA, Navarro OR, Paniccia L, Famiglietti A. Epidemiología molecular de aislados de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenems en Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 2019; 51(3):247-250.

Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Braz J Infect Dis 2001; 5(4):200-14.

Sahl JW, Del Franco M, Pournaras S, Colman RE, Karah N, Dijkshoorn L, Zarrilli R. Phylogenetic and genomic diversity in isolates from the globally distributed *Acinetobacter baumannii* ST25 lineage. *Sci Rep*. 2015 14(5):15188.

Salipante SJ, SenGupta DJ, Cummings LA, Land TA, Hoogestraat DR, Cookson BT. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *J Clin Microbiol* 2015; 53(4):1054-55.

Schuertz KF, Tuon FF, Palmeiro JK, Conte DT, João PM, Trevisoli LE Dalla-Costa LM. Bacteremia and meningitis caused by OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* – molecular characterization and susceptibility testing for alternative antibiotics. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018, 49(1):199-204.

Schurch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018, 24(4): 350-54.

Sheikhalizadeh V, Hasani A, Rezaee MA, Rahmati-Yamchi M, Hasani A, Ghotaslou R, Goli HR. Comprehensive study to investigate the role of various aminoglycoside resistance mechanisms in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Chemother* 2017; 23(2):74-79.

Silva KE, Maciel WG, Croda J, Cayô R, Ramos AC, de Sales RO. A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit. *PLoS ONE*. 2018, 13(12): e0209367.

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

Sevillano E, Fernández E, Bustamante Z, Zabalaga S, Rosales I, Umaman A, Gallego L. Emergence and clonal dissemination of carbapenem-hydrolysing OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Bolívia. J Med Microbiol 2012; 61:80-84.

Smith CL, Condemine G. New approaches for physical mapping of small genomes. Journal of Bacteriology 1990, 172: 1167-1172.

Su CH, Wang JT, Hsiung CA, Chien LJ, Chi CL, Yu HT, Chang FY e Chang SC. Increase of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in acute care hospitals in Taiwan: association with hospital antimicrobial usage. PLoS One 2012; 7:e37788.

Suárez C, Gudiol F. Beta-lactam antibiotics. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008; 27(2): 116-29.

Sun B, Liu H, Jiang Y, Shao L, Yang S, Chen D. New mutations involved in colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. mSphere 2020; 5(2).

Tavares LCB. Caracterização genética e perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* presentes em um hospital de ensino. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências. 2017.

Tenover FC, Arbeit RD e Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol 1997; 18:426-39.

The World Population Prospects: 2015 Revision -
<https://www.un.org/en/development/desa/publications/world-population-prospects-2015-revision.html>

Tidwell TT. Hugo (Ugo) Schiff, Schiff Bases, and a Century of β -Lactam Synthesis. *Angew Chem Int* 2007; 47(6):1016-20.

Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M, Group AS. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:161-167.

Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Piker R, Livermore DM, et al. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 200; 258:72-7.

Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2974-76.

Turton JF, Kaufmann ME, Gill MJ, et al. Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(7):2630-4.

Urban C, Segal-Maurer S, Rahal JJ. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Dis* 2003; 36:1268-74.

Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev* 2003; 16: 430–450.

Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, Van der Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell J. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2007; 45(2): 453–60.

Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect 2007; 13:1e46.

Van Den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, De Brauwier E, Mascini EM, Van Der Reijden TJ, Spanjaard L, Thewessen EA, Van Der Zee A, Van Zeijl JH, Dijkshoorn L. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. Clin Microbiol Infect 2006; 12(9):837-43.

Van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P, Verhoef J, Brisse S. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. Res Microbiol. 2004; 155(2): 105-12.

Vasconcelos AT, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucarevski BR, Cabral BG, Brasiliense DM, Rossi F, Furtado GH, Carneiro IC, da Silva JO, Ribeiro J, Lima KV, Correa L, Britto MH, Silva MT, da Conceição ML, Moreira M, Martino MD, de Freitas MR, Oliveira MS, Dalbem MF, Guzman RD, Cayô R, Morais R, Santos SA, Martins WM. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. Diagn Microbiol Infect Dis 2015; 4:382-85.

Vasconcellos FM, Tiba-Casas MR, Tavares LCB, Souza WV, Garcia DO, Camargo CH. Evaluation of a new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clonal complexes circulating in Brazil. Infect Genet Evol. 2017a; 54:4-6.

Vasconcelos AT, et al. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 83:382–85.

Vaz CSL. Determinação da Diversidade Fenotípica e Genotípica de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 135p. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

Viehman JA, Nguyen MH, Doi Y. Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Drugs.* 2015; 74(12):1315-33.

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

Wang J, Ruan Z, Feng Y, Fu Y, Jiang Y, Wang H, Yu Y. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. *PLoS One* 2017; 9(8):e104882.

Werneck JS, Picão RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother* 2011a; 66(2):452-547

Werneck JS, Picão RC, Girardello R, Cayô R, Marguti V, Dalla-Costa L e Gales AC. Low prevalence of bla_{OXA-143} in private hospitals in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2011b; 55:4494-95.

Willems S, Kampmeier S, Bletz S, Kossov A, Köck R, Kipp F, Mellmann A. Whole-Genome Sequencing Elucidates Epidemiology of Nosocomial Clusters of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(9):2391-94.

Wisplinghoff H, Scmitt R, Wohrmann A, Stefanik D, Seifert H. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Hosp Infect 2007; 66(2):174-181.

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev 2011; 35:736-55.

Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. Clin Microbiol Rev 2017; 30:409e47.

Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2001; 47(4):399-403.

Wu W, He Y, Lu J, Lu Y, Wu J, Liu Y. Transition of bla_{OXA-58-like} in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Southern China: An 8-year study. PLoS One 2015; 10:e0137174.

Zander E, Bonnin RA, Seifert H, Higgins PG. Characterization of bla_{OXA-143} Variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014.

Zarrili R, Casillo R, Di Popolo A, Tripodi M-F, Bagattini M, Cuccurullo S, Crivaro V, Ragone E, Mattei A, Galdieri N, Triassi M, Utili R. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. Clinical Microbiology and Infection 2007; 13(5): 481-89.

8.1 Preparo de soluções

Tris 1M, pH 8,0

- Tris base 121,1 g
- H₂O dest 800 mL
- HCl 42 mL
- H₂O Ultra pura q.s.p 1000 mL

Autoclavar

EDTA 0,5M, pH 8,0

- EDTA 93,06 g
- H₂O dest 300 mL
- Ajustar pH ± 10 g de NaOH
- H₂O Ultra pura q.s.p 500 mL

Autoclavar

Tampão TE (10Mm Tris, 1mM EDTA, pH 8,0)

- Tris 1 M pH 8,0 10 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0 2 mL
- H₂O Ultra pura q.s.p 1000 mL

Tampão de Suspensão Celular – Cell Suspension Buffer – CSB (100 mM

Tris, 100 mM EDTA, pH 8,0)

- Tris 1 M pH 8,0 10 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0 20 mL
- H₂O Ultra pura q.s.p 100 mL

Tampão de Lise Celular – Cell Lysis Buffer – CLB (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0, 10% sarcosil)

- Tris 1 M Ph 8,0 25 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0 50 mL
- Sarcosil 10% 50 mL

- H₂O Ultra pura q.s.p 500 mL

Agarose para plug - PFGE (Seakem Gold)

- 1,2 g pulsed field certified agarose – ultra pura DNA grade agarose
- 100 mL de TE

Agarose para eletroforese - PFGE (Seakem Gold)

- 1,0 g agarose pulsed field electrophoresis: running gel (Sigma)
- 100 mL H₂O ultra pura

Tampão Tris Borato (TBE)

- TBE 10x []

Ácido bórico	55 g
Tris base	108 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	40 mL
H ₂ O Ultra pura q.s.p	1000 mL
- Preparo de TBE 0,5x []

1L: 950 mL de H₂O ultra pura e 50 mL de TBE 10x

2L: 1900 mL de H₂O ultra pura e 100 mL de TBE 10x

Tampão TE (Tris 10mM: EDTA 1mM, pH 8,0)

- Tris-HCl 1 M pH 8,0 10 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0 2 mL
- H₂O Ultra pura q.s.p 1000 mL

Nota: O TE é usado para a preparação da agarose Seaken Gold e para lavar os plugs após a lise.

Proteinase K (20 mg/mL)

- Proteinase K em pó
- H₂O Ultra pura q.s.p

Dissolver, distribuir em tubos eppendorf e armazenar a -20°C (utilizar máscara de proteção para pesagem). Quantidade a ser pesada depende do fabricante.

Lisozima (40 mg/mL)

- Lisozima em pó
- H_2O Ultra pura q.s.p

Dissolver, distribuir em tubos eppendorf e armazenar a -20°C (utilizar máscara de proteção para pesagem). Quantidade a ser pesada depende do fabricante.

Mix para fazer o plug do PFGE

- Para 10U Apal: 1 μL
 Buffer: 15 μL
 BSA: 1,5 μL
 H_2O : 132,5 μL
- Para 15U Apal: 1,5 μL
 Buffer: 15 μL
 BSA: 1,5 μL
 H_2O : 123 μL
- Para 20U Apal: 2 μL
 Buffer: 15 μL
 BSA: 1,5 μL
 H_2O : 131,5 μL

Brometo de Etídio

- Solução estoque = 10mg/mL
- Diluir 1:10.000 com H_2O Ultra pura (10 μL em 100 mL de H_2O),
concentração final

Preparo do Caldo Muller-Hinton Cátion Ajustado - Para CIM

- Para 1 placa: 50 μL por poço x 12 poços = 600 μL (fazer 700 μL para não faltar CMHCA)

$C_1 = []$ do antibiótico (1mg/mL)

$C_2 = > []$ a ser testada

$V_2 =$ volume final

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$1000 \cdot V_1 = 32 \cdot 0,7$$

$$V_1 = 0,0224 \text{ mL}$$

$$V_1 = 22,4 \mu\text{L do antibiótico}$$

$$+ 677,6 \mu\text{L de CMHCA}$$

Porém tem que fazer uma diluição 1:2, logo necessita-se começar com o dobro do volume (1,5 μL):

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$1000 \cdot V_1 = 32 \cdot 1,5$$

$$V_1 = 0,048 \text{ mL}$$

$$V_1 = 48 \mu\text{L do antibiótico}$$

$$+ 1452 \mu\text{L de CMHCA}$$

8.2 Artigos publicados no período de pós-graduação

Bueno MS, Freire MP, Cunha MPV, Barcellos TAF, Bertani AMJ, Santos CA, Chimara E, Nagamori FO, Takagi EH, Abdala E, Carvalho E, Tiba-Casas MR, Camargo CH. Detection of pandrug-resistant ST15 *Acinetobacter baumannii* causing bloodstream infection in an HSCT patient in Brazil. J Antimicrob Chemother, 2020; 75(9): 2691-2693.

Barcellos TAF, Bueno MS, Cunha MPV, Nagamori FO, Carvalho E, Takagi EH, Moreno LZ, Moreno AM, Chimara E, Tiba-Casas MR, Camargo CH. Silent mutations in ribosomal protein genes are associated with high-risk clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* prevalent in Brazil. Infection, Genetics and Evolution, 2021; 88.

Camargo CH, Cunha MPV, Barcellos TAF, Bueno MS, Bertani AMJ, Santos CA, Nagamori FO, Takagi EH, Chimara E, Carvalho E, Tiba-Casas MR. Genomic and phenotypic characterisation of antimicrobial resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* hyperendemic clones CC1, CC15, CC79 and CC25. International Journal of Antimicrobial Agents, 2020; 56.

Tavares LCB, Cunha MPV, Vasconcellos FM, Bertani AMJ, Barcellos TAF, Bueno MS, Santos CA, Sant'Ana DA, Ferreira AM, Mondelli AL, Montelli AC, Sadatsune T, Sacchi CT, Gonçalves CR, Tiba-Casas MR, Camargo CH. Genomic and Clinical Characterization of IMP-1-Producing Multidrug-Resistant *Acinetobacter bereziniae* Isolates from Bloodstream Infections in a Brazilian Tertiary Hospital. Microbial Drug Resistance, 2020; 26(11): 1399-1404.

Genomic and Clinical Characterization of IMP-1-Producing Multidrug-Resistant *Acinetobacter bereziniae* Isolates from Bloodstream Infections in a Brazilian Tertiary Hospital

Lais Calissi Brisolla Tavares,^{1,2} Marcos Paulo Vieira Cunha,³ Francielli Mahnic de Vasconcellos,¹ Amanda Maria de Jesus Bertani,¹ Thays Almeida Franco de Barcellos,^{1,2} Mariana Sardinha Bueno,^{1,2} Carla Adriana Santos,¹ Daniel Almeida Sant'Ana,¹ Adriano Martison Ferreira,⁴ Alessandro Lia Mondelli,⁴ Augusto Cezar Montelli,⁴ Terue Sadatsune,⁵ Claudio Tavares Sacchi,⁶ Claudia Regina Gonçalves,⁶ Monique Ribeiro Tiba-Casas,¹ and Carlos Henrique Camargo^{1,2}

Acinetobacter baumannii is the main species of the *Acinetobacter* genus; however, non-*baumannii* *Acinetobacter* (NBA) species causing infections have been described for the past years, as well as antimicrobial resistance. In this study, we describe the occurrence of two multidrug-resistant (MDR) IMP-1-producing *Acinetobacter bereziniae* isolates recovered from bloodstream infections in different patients but in the same intensive care unit among 134 carbapenem-resistant *Acinetobacter* screened. Antimicrobial susceptibility testing revealed resistance to carbapenems, extended spectrum, and antipseudomonad cephalosporins, amikacin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. Both *A. bereziniae* isolates shared the same *Apal*-pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) pattern. Whole-genome sequencing of both isolates revealed that *bla*_{IMP-1} was embedded into an In86 Class I integron carrying also *sul1*, *aac(6')-31*, and *aadA* genes. A new sequence type (ST1309 Pasteur) was deposited. The virulence genes *lpxC* and *ompA*, seen in *A. baumannii*, were detected in the *A. bereziniae* strains. Recognition of *A. bereziniae* causing invasive MDR infection underscores the role of NBA species as human pathogens especially in at-risk patients.

Keywords: *Acinetobacter bereziniae*, IMP-1, whole genome sequencing, next-generation sequencing, Ion Torrent

Introduction

ACINETOBACTER SPP. ARE recognized as important opportunistic pathogens causing health care-associated infections around the globe. Their ability to resist disinfection and desiccation and to acquire multiple mechanisms of antimicrobial resistance underscores the importance of infections caused by these pathogens.¹⁻⁴ The threat of *Acinetobacter baumannii* is well known; nevertheless, many species of *Acinetobacter* other than *A. baumannii* have become important causes of nosocomial diseases and often accumulate antimicrobial-resistance mechanisms.⁵

Although carbapenem resistance in *A. baumannii* is mainly mediated by carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase (CHDL) OXA-enzymes, non-*baumannii* *Acinetobacter* (NBA) usually carry metallo- β -lactamases, with NDM, IMP, and VIM being the most frequently identified enzymes in both nosocomial and environmental samples.⁶⁻⁹

IMP was the first acquired metallo-beta-lactamase (MBL) described¹⁰ and is currently spread worldwide.¹¹⁻¹³ IMP enzymes may be detected in *A. baumannii*, but it is mainly harbored by NBA, such as *A. radioresistens*, *A. ursingii*, and *Acinetobacter bereziniae*, which are opportunistic and formerly known as environmental species. However, NBA species have risen as relevant pathogens, causing nosocomial infections in increasing frequencies for the past years.¹⁴⁻²⁰ Since carbapenemase genes are usually associated with mobile genetic elements in NBA, those species can be implicated in horizontal gene transfer to more frequent clinical species, such as *A. baumannii*.

Among the NBA, *A. bereziniae* is considered an emerging pathogenic species and has been associated with some carbapenemase enzymes. As in other *Acinetobacter* species, *A. bereziniae* carries intrinsic oxacillinases, which are variants of OXA-228-like group able to confer carbapenem resistance *in vitro*.²¹ In addition, *A. bereziniae* has been associated with

¹Centro de Bacteriologia, and ⁶Laboratório Estratégico, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil.

²Faculdade de Medicina, and ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴Faculdade de Medicina de Botucatu, and ⁵Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil.

IMP-1, IMP-19, IMP-5, SIM-1, VIM-2, and NDM-1 metallo-beta-lactamases, being able to harbor concomitantly even two different types of MBL.^{22–24}

This study aims to describe the clinical and the microbiological findings of bloodstream infection (BSI) due to *A. bereziniae* in two patients from a teaching hospital in inner Brazil.

Materials and Methods

This study was approved as a retrospective study by the Local Research Ethics Committee (Process CAAE 49985115.5.0000.0059). We were granted an exemption from the requirement to obtain written informed consent from the participants and/or their legal guardians because the isolates included in the study had already been stored, on an ongoing basis, in the Culture Collection of the Department of Microbiology and Immunology, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

As part of a retrospective study on the mechanisms leading to carbapenem resistance in *Acinetobacter* species from BSIs of patients treated at Botucatu Medical School Hospital/UNESP (BMSH/UNESP), a tertiary hospital in inner Brazil with 415 beds (52 intensive care unit [ICU] beds), during the period of 2007–2014, a total of 134 isolates from nonrepetitive individuals were screened for the main CHDL, serine, and metallo-carbapenemase genes.^{25–27} Of which, those that presented positive PCR results to *bla*_{IMP-like} genes were further investigated. *bla*_{IMP} allele was determined by Sanger sequencing. Partial *rpoB* gene and 16S-23S rRNA gene intergenic spacer (ITS) region sequencing^{28,29} was carried out to identify the species, since the isolates were negative to the *bla*_{OXA-51-like} gene. *Apa*I-restricted genomic DNA fragments were resolved using pulsed-field gel electrophoresis³⁰ and the restriction patterns were analyzed using the software BioNumerics v. 7.6.2 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Presence of large plasmids was evaluated by using 10 U of S1-nuclease (Promega) detected with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and the molecular weight Lambda PFG Marker (NewEngland Biolabs) to estimate their sizes. Small plasmids were extracted with PureYield™ Plasmid Miniprep System Protocol (Promega). Conjugation and transformation were attempted using the *A. bereziniae* strains as donors and *Escherichia coli* J53 and *E. coli* DH10β as recipient strains, respectively. In addition isolates of *A. baumannii* ATCC 19606, ATCC 13304 and ATCC 747 were also employed for conjugation experiments. Selection was made in MacConkey plates containing sodium azide (100 mg/L; Sigma Aldrich, St. Louis, only for *E. coli*) and imipenem (1 µg/mL; Sigma Aldrich) or cefotaxime (1, 2 µg/mL; Sigma Aldrich).

Minimum inhibitory concentration values were determined by using the Sensititre™ Gram Negative GNX3F AST Plate (ThermoFisher Scientific, MA) according to the fabricant recommendations. For polymyxin and colistin (Sigma, St. Louis, MO), the in-house broth microdilution method was carried out in untreated 96-well polystyrene microplates and cation-adjusted BBL Mueller–Hinton broth (BD, Franklin Lakes, NJ), since nonreliable results were found for Enterobacteriaceae by using the Sensititre approach.³¹

Breakpoints employed to define susceptibility, intermediate or resistance followed Clinical and Laboratory Stan-

dards Institute recommendations³² except for tigecycline, for which the U.S. Food and Drug Administration breakpoints were applied (susceptible: ≤2 µg/mL; resistant: ≥8 µg/mL).

Isolates were categorized as multidrug resistant (MDR, nonsusceptibility to ≥1 agent in ≥3 antimicrobial categories among aminoglycosides, antipseudomonal carbapenems, antipseudomonal fluoroquinolones, antipseudomonal penicillins + β-lactamase inhibitors, extended-spectrum cephalosporins, folate pathway inhibitors, penicillins + β-lactamase inhibitors, polymyxins, tetracyclines) or extensively drug-resistant (XDR, nonsusceptibility to ≥1 agent in all but ≤2 categories), as described elsewhere.³³

The IMP-producing isolates were subjected to whole-genome shotgun sequencing. Genomic DNA was extracted using the Promega Wizard Extraction Kit, according to the manufacturer's instructions and by adding 5 µL of proteinase K (20 mg/mL) and lysozyme (40 mg/mL) during the initial lysis step. DNA libraries were prepared at the Strategic Laboratory, Adolfo Lutz Institute, and sequenced using the Ion Torrent S5 (Life Technologies). The 520 Chip paired with a 200-bp library was chosen for maximum coverage. Raw reads were *de novo* assembled using SPAdes v.3.1. The FASTA files were submitted to online pipelines for bacterial identification on rMLST and Kmer tool, detection of antimicrobial resistance and virulence genes on CARD, ResFinder, and BactDB. Sequence types were determined by the Institute Pasteur MLST Scheme. Contigs carrying resistance genes were manually annotated using the Geneious v.9.1.9 (Biomatters) and CLC v.11.1 (QIAGEN). Images of genetic environment were done using the EasyFig software.³⁴

Using the raw reads of L98 and L65 strains, and other genomes of *A. bereziniae* deposited in GenBank database, a whole genome phylogenetic analysis based on the concatenated alignment of the high-quality single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed using CSI Phylogeny (version 1.4) with default input parameters.³⁵ *A. bereziniae* XH901 strain was used as reference genome. Sequences of L65 and L98 were deposited in GenBank under accession numbers SIRC01000000 and SIRC01000000, respectively.

Results

Out of the 134 carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. analyzed, 2 (1.3%) presented positivity for the *bla*_{IMP-like} gene, further identified as *bla*_{IMP-1} by sequencing. We did not detect any other carbapenemase gene (SPM, IMP, VIM, KPC, NDM, and OXA-48) in the remaining 132 isolates. Those isolates were recovered from two different patients, as described hereunder.

Patients characterization

Patient 1, male, 62 years old, admitted to the emergency room after being ejected out his car after automobile collision with another vehicle. He did not present comorbidities. After the initial measures for treatment of traumatic injuries, patient remained hospitalized in the ICU of the emergency room (ICU-ER). On day 7 presented positive blood catheter culture for *Acinetobacter* sp. L65 (initially identified as *A. lwoffii* by Vitek 2, BioMérieux). Blood culture revealed also the presence of *Pseudomonas* sp. On the same day,

meropenem therapy was initiated for 14 days. Tracheostomy was performed on day 14 following local protocol for intubated patients. On day 17 peripheral blood culture grew again *Acinetobacter* sp. and the therapy was changed to ampicillin-sulbactam; patient responded well. He remained hospitalized until total recovering of traumatic injuries by the day 45, when he was discharged presenting overall good condition and without clinical signs of infection and microbiological cultures testing negative.

Patient 2, female, 66 years old, history of hypertension, type 2 diabetes mellitus, and hypothyroidism. Admitted to the emergency room complaining of cough for 1 week and worsening of basal dyspnea for 3 days. Initial X-ray indicated increased cardiac area, with diffuse infiltrate and signs of venous congestion. Orotracheal intubation (OTI) was initiated because of low SatO₂, but post-OTI shock was verified. The new X-ray after the OTI showed bilateral pulmonary congestion and cardiomegaly, suggesting decompensated congestive heart failure due to bronchial infection. Antimicrobial therapy was promptly initiated with levofloxacin 750 mg on day 16, same day in which two blood cultures were positive and the tracheal secretion quantitative cultured negative, but patient did not evolve well. On day 17 therapy was changed to vancomycin + piperacillin/tazobactam and patient presented worsening of overall conditions, with transfer to the ICU-ER. On day 30 presented a positive blood culture for *Acinetobacter* sp. L98, with MDR profile. Hemodialysis therapy was started on day 50 due to kidney failure. Patient remained hospitalized at ICU-ER and evolved to toxic-metabolic encephalopathy secondary to hypernatremia and sepsis, with multiple complications: respiratory failure, critical neuropathy, cardiorespiratory arrest in electrical activity without pulse, thrombus pulmonary embolism treated with anticoagulation therapy, acute renal failure, fungal urinary tract infection, and anemia. On day 110 tracheal secretion was positive for imipenem-resistant *Pseudomonas* sp. (in counts >1 million colony forming U/mL), treated with polymyxin B, but patient evolved to death on day 128 due to multiple organ failure.

Isolates characterization

Partial *rpoB* and ITS region sequencing identified both isolates (L65 and L98) as *A. bereziniae*, and PFGE revealed similarity of 100% between them (Supplementary Fig. S1). Putative plasmids were detected in S1-PFGE (two plasmids of sizes ~55 kb and <<20 kb) and in kit extraction (~7 kb) (Supplementary Figs. S2 and S3). The *bla*_{IMP-1} gene was unsuccessfully transferred from the *A. bereziniae* to the *A. baumannii* ATCC 19606 strain by conjugation after several attempts.

According to the susceptibility tests, both *A. bereziniae* were considered MDR, presenting resistance to carbapenems, extended spectrum and antipseudomonad cephalosporins, amikacin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. Although resistance to ciprofloxacin was not detected, both isolates presented intermediate susceptibility to this drug. Polymyxin B resistance was not detected.

Identification of both isolates was confirmed as *A. bereziniae* by the rMLST (100% support and 48 exact matches) and kmer (z-score 1007.3 for L65 and 1006.5 for L98)

analysis on whole genome sequencing data. Additional genome sequencing data are presented in Supplementary Table S1. The same antimicrobial resistance genes were detected in both strains: *bla*_{IMP-1}, *bla*_{OXA-356}, and *CARB-8* (resistance to beta-lactams), *sul1* (resistance to sulfonamides), *aph(3')-Via*, *aac(6')-31*, and *aadA1* (resistance to aminoglycosides), *msr(E)* and *mph(D)* (acquired resistance to macrolides). In addition, the efflux pump gene *adeF* was also detected.

Analysis of *bla*_{IMP-1} genetic context revealed its occurrence into a class I integron, *In86*, which also carried the *sul1*, *aac(6')-31*, and the *aadA1* genes (Fig. 1).

Through genome assembly analysis, no circularized plasmids were found, only contigs containing coding regions for proteins present in plasmids and other mobile genetic elements.

After uploading our data on MLST (Pasteur Scheme) website, novel alleles were assigned for all the seven genes, and the novel sequence type 1309 was assigned to the alleles combination *cpn60* (194); *fusA* (186); *gltA* (180); *pyrG* (91); *recA* (194); *rplB* (101); *rpoB* (169).

A phylogenetic tree built based on whole genome SNPs of L65, L98, and genomes of eight strains available in GenBank showed that the genomes of L65 and L68 were closely related (Fig. 2). Interesting, two branches grouped carbapenemase-producing strains from India, Brazil, and Argentina, as well as a noncarbapenemase-producing strain from the United States. An intermediate branch grouped L65 and L98 together.

According to the BACdb website the following putative virulence genes associated with *A. baumannii* species were detected in both the L65 and L98 *A. bereziniae* strains: *ompA*, which codifies an important outer membrane protein of *A. baumannii* and *A. nosocomialis*, associated with multiple virulence pathways such as inhibition of the alternative complement activation by binding factor H, biofilm formation on abiotic surfaces, and adherence to and invasion of host cells; *bfmR*, associated with regulation of two-component system; *lpxC* (associated with lipopolysaccharide production) and ABZJ_00085 and ABZJ_00086, putative IS4 family transposases open read frame.

Discussion

In this study, we identified two MDR carbapenem-resistant IMP-1-producing *A. bereziniae* strains isolated from BSIs of patients with bacteremia attending in a teaching hospital in Brazil. *A. baumannii* is considered a major threat in health care-associated infections, but NBA species have emerged as important opportunistic agents carrying and spreading antimicrobial resistance determinants.⁵

Infections caused by *A. bereziniae* are rarely reported and this species is not frequently isolated. Nevertheless, it has already been identified in the nosocomial environment worldwide, including in Brazil, where studies had shown that this species may be the reservoir of *bla*_{IMP-1} and *bla*_{NDM-1} genes^{6,36} or even carry more than one MBL gene.²³ Our results correlate to this occurrence, since both strains carried *bla*_{IMP-1}, which was inserted into *In86*, as first described in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas putida* from the 2000s.³⁷ This same genetic context was found by Mendes *et al.* (2007) in a *A. baumannii* strain isolated from infected

FIG. 1. Schematic representation of contig harboring the In86 with the *blaIMP-1*. The total fragment length is 7,129 base pairs (bp), and the scale represents 1000 bp (1 Kbp).

skin and soft tissue in São Paulo, Brazil (GenBank accession no. AJ640197). More recently, In86 was also detected in *A. bereziniae* from a blood and tracheal secretion of two distinct patients attending at two distinct hospitals in the city of São Paulo, Brazil.⁶ Conjugation experiments failed to prove the occurrence of plasmid-borne *blaIMP-1*, and hybridization experiments targeting the *blaIMP-1* were not conclusive as well (data not shown). Therefore, with this evidence, we cannot assume that In86 is allocated into a plasmid. Long reads sequencing could answer this limitation of our study, but it was not performed.

Contrary to the clonal diversity reported by Cayô *et al.*, maybe explained by the source of the isolates, we verified

that both *A. bereziniae* strains of our study shared the same PFGE pattern and only a few SNPs, even though the samples were recovered from blood of two different patients more than 1 year apart (2012–2013). Such finding underscores the persistence of *A. bereziniae* in this ward and its potential as a pathogenic bacterium since it was isolated from BSIs in at-risk ICU patients.

To the best of our knowledge, this is the first study analyzing the resistance and virulence determinants by whole genome sequencing (WGS) of IMP-producing *A. bereziniae* isolates and contribute the knowledge of MBL among such species, since *bla_{NDM-1}* was already reported in isolates from a neighbor country, Argentina.^{38,39} WGS has permitted

FIG. 2. The whole genome SNP-based phylogeny tree of 10 *Acinetobacter bereziniae* genomes available in GenBank. The legends correspond to strain identification (GenBank accession number) country, year of isolation, and carbapenemase reported. All genomes were selected from strains recovered of human infections. Branch labels indicate substitution per site (patristic distances). SNP, single nucleotide polymorphism.

the total analysis of the bacterial genome, allowing the identification of resistance and virulence genes.

In the *A. bereziniae* isolates, several resistance genes were detected, in accordance with the MDR pattern detected by the phenotypic methods. The OXA-228 group, which includes the OXA-228, OXA-229, OXA-355, and OXA-356 enzymes, is the intrinsic OXA group in this species (www.bldb.eu/). Thus, L65 and L98 *A. bereziniae* carried the expected intrinsic OXA-enzyme.^{21,40}

Compared with the available *A. bereziniae* genomes by SNPs analysis, the L65 and L98 strains were closely related to each other, but were not grouped with carbapenemase-producing strains from Brazil, Argentina, or India, or with the other genomes used in our analysis. There are few genomes of this species deposited in public databases and very little information about genomic diversity of *A. bereziniae*. Our phylogenetic analysis showed point differences among the analyzed genomes, suggesting that this species can present similar genetic features among lineages circulating worldwide. This evidence can be illustrated by the fact that other genomes of *A. bereziniae* from Brazil (374/14 strain, not published) used in our analysis was grouped with a strain from the United States, and not with L65 and L98.

Indeed, by using the *A. baumannii* database, we identified five putative virulence genes in both *A. bereziniae* isolates, at least one (*ompA*) with recognized function associated with adherence and invasion, biofilm formation and persistence on abiotic surfaces, highlighting the pathogenic potential of these strains. Adequate antimicrobial therapy is, therefore, mandatory to improve patients' survival. In our description, one of the two cases (L98) evolved to death, but a lot of comorbidities were also reported.

Conclusion

This study reinforces the importance of identifying NBA, since despite the low frequency of infections caused by *A. bereziniae*, the two strains reported in this study were isolated from invasive infections. Moreover, both strains were considered MDR and harbored the *bla*_{IMP-1} gene embedded into In86 (flanked by *Int1* and *tniB*). Such finding represents a reservoir of antimicrobial resistance genes that can further disseminate to other strains or even species, impairing successful antimicrobial therapy in severe infections.

Acknowledgments

We thank the team of curators of the Institut Pasteur Acinetobacter MLST system for curating the data and making them publicly available at <http://pubmlst.org/abaumannii/>, and especially the kind assistance of Dr. Raffaele Zarrilli.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Funding Information

This study was supported by the grant nos. 2015/13179-4, 2016/20727-0, and 2017/16988-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. C.H.C. has received Productivity Research Fellows from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Supplementary Material

Supplementary Table S1
Supplementary Figure S1
Supplementary Figure S2
Supplementary Figure S3

References

- Maragakis, L.L., and T.M. Perl. 2008. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin. Infect. Dis. 46:1254–1263.
- Peleg, A.Y., and D.L. Paterson. 2006. Multidrug-resistant *Acinetobacter*: a threat to the antibiotic era. Intern. Med. J. 36:479–482.
- Peleg, A.Y., H. Seifert, and D.L. Paterson. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 21:538–582.
- Kramer, A., I. Schwebke, and G. Kampf. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infect. Dis. 6:130.
- Al Atrouni, A., M.-L. Joly-Guillou, M. Hamze, and M. Kempf. 2016. Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* species. Front. Microbiol. 7:49.
- Cayô, R., A.P. Streling, C.S. Nodari, A.P. Matos, A. de Paula Luz, L. Dijkshoorn, A.C.C. Pignatari, and A.C. Gales. 2018. Occurrence of IMP-1 in non-*baumannii* *Acinetobacter* clinical isolates from Brazil. J. Med. Microbiol. 67:628–630.
- Bonnin, R.A., A.A. Ocampo-Sosa, L. Poirel, H. Guet-Revillet, and P. Nordmann. 2012. Biochemical and genetic characterization of carbapenem-hydrolyzing β -lactamase OXA-229 from *Acinetobacter bereziniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 56:3923–3927.
- Park, Y.K., S.-I. Jung, K.-H. Park, S.H. Kim, and K.S. Ko. 2012. Characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii* in South Korea. Int. J. Antimicrob. Agents 39:81–85.
- Sung, J.Y., S.H. Koo, S. Kim, and K.C. Kwon. 2014. Epidemiological characterizations of class 1 integrons from multidrug-resistant *Acinetobacter* isolates in Daejeon, Korea. Ann. Lab. Med. 34:293.
- Watanabe, M., S. Iyobe, M. Inoue, and S. Mitsuhashi. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 35:147–151.
- Matsumura, Y., G. Peirano, M.R. Motyl, M.D. Adams, L. Chen, B. Kreiswirth, R. DeVinney, and J.D. Pitout. 2017. Global molecular epidemiology of IMP-producing Enterobacteriaceae. Antimicrob. Agents Chemother. 61: e02729-16.
- Kazmierczak, K.M., S. Rabine, M. Hackel, R.E. McLaughlin, D.J. Biedenbach, S.K. Bouchillon, D.F. Sahm, and P.A. Bradford. 2016. Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 60:1067–1078.
- Mojica, M.F., R.A. Bonomo, and W. Fast. 2016. B1-Metallo- β -Lactamases: where do we stand? Curr. Drug Targets 17:1029–1050.
- Kouyama, Y., S. Harada, Y. Ishii, T. Saga, A. Yoshizumi, K. Tateda, and K. Yamaguchi. 2012. Molecular characterization of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* spp. in Japan: predominance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 and IMP-type metallo- β -lactamase-producing non-*baumannii* *Acinetobacter* species. J. Infect. Chemother. 18:522–528.

15. Pagano, M., A.F. Martins, and A.L. Barth. 2016. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Braz. J. Microbiol.* 47:785–792.
16. Bonomo, R.A., and D. Szabo. 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* 43 Suppl 2:S49–S56.
17. Chatterjee, S., S. Datta, S. Roy, L. Ramanan, A. Saha, R. Viswanathan, T. Som, and S. Basu. 2016. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. causing neonatal sepsis: focus on NDM-1 and its linkage to ISAbal25. *Front. Microbiol.* 7:1126.
18. Lu, P.-L., L.-Y. Huang, S.-T. Lian, K. Chang, C.-L. Lin, I.-J. Hwang, W.G. Chiang, Y.H. Chen, S.F. Lin, and L.K. Siu. 2008. How carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. established in a newly constructed hospital. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31:463–466.
19. Zhang, R., Y.-Y. Hu, X.-F. Yang, D.-X. Gu, H.-W. Zhou, Q.-F. Hu, K. Zhao, S.F. Yu, and G.X. Chen. 2014. Emergence of NDM-producing non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. isolated from China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33:853–860.
20. Espinal, P., I. Roca, and J. Vila. 2011. Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in non-*baumannii* *Acinetobacter*. *Future Microbiol.* 6:495–511.
21. Kamolvit, W., P.G. Higgins, D.L. Paterson, and H. Seifert. 2014. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 69:959–963.
22. Turton, J.F., J. Shah, C. Ozongwu, and R. Pike. 2010. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *J. Clin. Microbiol.* 48:1445–1449.
23. Lee, K., C.K. Kim, S.G. Hong, J. Choi, S. Song, E. Koh, D. Yong, S.H. Jeong, J.H. Yum, J.D. Docquier, G.M. Rossolini, and Y. Chong. 2010. Characteristics of clinical isolates of *Acinetobacter* genomospecies 10 carrying two different metallo- β -lactamases. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36:259–263.
24. Grosso, F., L. Silva, C. Sousa, H. Ramos, S. Quinteira, and L. Peixe. 2015. Extending the reservoir of *bla*_{IMP-5}: the emerging pathogen *Acinetobacter bereziniae*. *Future Microbiol.* 10:1609–1613.
25. Woodford, N., M.J. Ellington, J.M. Coelho, J.F. Turton, M.E. Ward, S. Brown, S.G. Amyes, and D.M. Livermore. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27:351–353.
26. Higgins, P.G., M. Lehmann, and H. Seifert. 2010. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35:305.
27. Poirel, L., T.R. Walsh, V. Cuvillier, and P. Nordmann. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70:119–123.
28. La Scola, B., V.A. Gundi, A. Khamis, and D. Raoult. 2006. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 44:827–832.
29. Chang, H.C., Y.F. Wei, L. Dijkshoorn, M. Vaneechoutte, C.T. Tang, and T.C. Chang. 2005. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J. Clin. Microbiol.* 43:1632–1639.
30. Seifert, H., L. Dolzani, R. Bressan, T. van der Reijden, B. van Strijen, D. Stefanik, H. Heersma, and L. Dijkshoorn. 2005. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43:4328–4335.
31. Chew, K.L., M.-V. La, R.T.P. Lin, and J.W.P. Teo. 2017. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive Enterobacteriaceae: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *J. Clin. Microbiol.* 55:2609–2616.
32. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement M100-S19. Available at <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
33. Magiorakos, A.P., A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D.L. Paterson, L.B. Rice, J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T. Weber, and D.L. Monnet. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:268–281.
34. Sullivan, M.J., N.K. Petty, and S.A. Beatson. 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* 27:1009–1010.
35. Kaas, R.S., P. Leekitcharoenphon, F.M. Aarestrup, and O. Lund. 2014. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One* 9:e104984.
36. Chagas, T.P.G., A.P.D. Carvalho-Assef, C.A. Martins Aires, R. Bertocini, and M.D. Asensi. 2015. Detection of an NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* strain in Brazil. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 3:147–148.
37. Mendes, R.E., M. Castanheira, M.A. Toleman, H.S. Sader, R.N. Jones, and T.R. Walsh. 2007. Characterization of an integron carrying *bla*_{IMP-1} and a new aminoglycoside resistance gene, *aac(6')-3I*, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2611–2614.
38. Brovedan, M., P.M. Marchiaro, J. Morán-Barrio, S. Revale, M. Cameranesi, L. Brambilla, A.M. Viale, and A.S. Limansky. 2016. Draft genome sequence of *Acinetobacter bereziniae* HPC229, a carbapenem-resistant clinical strain from Argentina harboring *bla*_{NDM-1}. *Genome Announc.* 4:e00117-16.
39. Brovedan, M., P.M. Marchiaro, J. Morán-Barrio, M. Cameranesi, G. Cera, M. Rinaudo, A.M. Viale, and A.S. Limansky. 2015. Complete sequence of a *bla*(NDM-1)-harboring plasmid in an *Acinetobacter bereziniae* clinical strain isolated in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59:6667–6669.
40. Bonnin, R.A., L. Poirel, M. Licker, and P. Nordmann. 2011. Genetic diversity of carbapenem-hydrolysing β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Romanian hospitals. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:1524–1528.

Address correspondence to:

Carlos Henrique Camargo, PhD

Centro de Bacteriologia

Instituto Adolfo Lutz

Avenida Dr. Arnaldo, 355, 9º Andar, Pacaembu

São Paulo CEP 01246-902

Brazil

E-mail: carlos.camargo@ial.sp.gov.br

Research paper

Silent mutations in ribosomal protein genes are associated with high-risk clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* prevalent in Brazil

Thays Almeida Franco de Barcellos^{a,b,1}, Mariana Sardinha Bueno^{a,b,1},
 Marcos Paulo Vieira Cunha^b, Filipe Onishi Nagamori^a, Enéas de Carvalho^c,
 Elizabeth Harumy Takagi^a, Luisa Zanolli Moreno^b, Andrea Micke Moreno^b, Erica Chimara^a,
 Monique Ribeiro Tiba-Casas^a, Carlos Henrique Camargo^{a,b,*}

^a Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP 01246-902, Brazil

^b Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 01246-903, Brazil

^c Instituto Butantan, São Paulo, SP 05508-040, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

MLST
 MALDI-TOF
 Bruker
 High-risk clones
 Mass spectrometry
 WGS

ABSTRACT

Objectives: To analyze the relationship of ribosomal protein mutations and clonality of high-risk clones *Acinetobacter baumannii*.

Methods: Seventy-nine carbapenem-resistant *A. baumannii* were subjected to whole-genome sequencing (Illumina NextSeq), and codifying sequences of ribosomal proteins were extracted and screened for mutations. MALDI-TOF MS analysis (Bruker Biotyper) and Spectra data from MALDI-TOF was employed to generate a dendrogram based on principal component analysis (PCA) data. Clones were identified by Multilocus sequencing typing (MLST) based on WGS.

Results: Ribosomal RNA protein sequences extracted from the genomes identified mutations that were associated with clonal complexes, but most of them were silent. PCA did not cluster the isolates according to their clonality identified by MLST.

Conclusions: By comparing the nucleotide and amino acid sequences of diversified *A. baumannii*, and Bruker Biotyper profiles, we showed that silent mutations in ribosomal RNA nucleotides are associated with clonal complexes, but since most of the mutations were silent, MALDI-TOF MS raw data was not a useful tool for typing the high-risk clones of this species.

1. Introduction

Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) is a leading pathogen causing bloodstream infections with high mortality rates in Brazil (Marra et al., 2011), a continental country with hyperendemic prevalence of CRAB infections (Fortaleza et al., 2017; Rossi, 2011). Several tools are employed to determine the clonal relationship among *A. baumannii*, such as pulsed-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing (MLST), three-loci sequence typing and whole-genome MLST (Rafei et al., 2014, 2019). Despite the different discriminatory

abilities of such methodologies, all of them are laborious, time-consuming and require specialized personal and equipment resources. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has emerged as a new, fast, accurate, and cost-effective methodology for bacterial and yeast identification in the last years (Clark et al., 2013), based on the characteristics of ribosomal proteins. The accuracy of this method has continuously been proven for several pathogens, and some authors suggest that the role of MALDI-TOF MS can be enlarged, for example, for antimicrobial susceptibility (Sanguinetti and Posteraro, 2016) and epidemiological typing (Sauget et al.,

* Corresponding author at: Instituto Adolfo Lutz, Centro de Bacteriologia, Núcleo de Doenças Entericas e Infecções por Patógenos, Especiais Avenida Dr. Arnaldo, 351 - 9º Andar, CEP 01246-902, Pacaembu, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail addresses: thays_barcellos@usp.br (T.A.F. de Barcellos), marianasbueno@usp.br (M.S. Bueno), marcospvc@usp.br (M.P.V. Cunha), filipe.nagamori@ial.sp.gov.br (F.O. Nagamori), eneas.carvalho@butantan.gov.br (E. de Carvalho), elizabeth.takagi@ial.sp.gov.br (E.H. Takagi), luisa.moreno@usp.br (L.Z. Moreno), morenoam@usp.br (A.M. Moreno), erica.chimara@ial.sp.gov.br (E. Chimara), monique.casas@ial.sp.gov.br (M.R. Tiba-Casas), carlos.camargo@ial.sp.gov.br (C.H. Camargo).

¹ Both authors contributed equally to this study.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104686>

Received 22 October 2020; Received in revised form 9 December 2020; Accepted 19 December 2020

Available online 21 December 2020

1567-1348/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Fig. 1. Dendrogram generated based on the mutations (presence: black; absence: white) in ribosomal proteins genes in relation to reference strains AB030 for 79 carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates. Binary data were analyzed by Jaccard correlation and UPGMA clustering method. Colored squares indicated the Clonal Complex determined by MLST (Institute Pasteur Scheme): blue, CC1; green, CC15; red, CC25; magenta, CC79; gray, singletons. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

2017), especially for resistant bacteria in hospital settings. *Acinetobacter* species can be assertively identified by MALDI-TOF MS (Marí-Almirall et al., 2017), but previous studies diverged about the ability of MALDI-TOF MS in discriminating CRAB clones (Mencacci et al., 2013; Sousa et al., 2015). To contribute to this discussion, we evaluated the ability of MALDI-TOF MS analysis for typing purposes in a collection of 79 CRAB high-risk clones recovered from different hospitals in Brazil, associating the mass spectrometry results with the same targeting codifying DNA sequence region.

2. Methods

2.1. Bacterial isolates

As the Sao Paulo State Public Health reference laboratory for identification, phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial-resistant Gram-negative pathogens, Instituto Adolfo Lutz receives on a voluntary and ongoing basis isolates from public and private hospitals. Organisms identification was initially carried out with phenotypic and biochemical tests (Gram-stain, oxidase negative, glucose oxidation, absence of motility, growth in MacConkey, tolerance to 42 and 44 °C) and with detection of the intrinsic *bla*_{OXA-51}-like gene in a multiplex PCR assay targeting the main oxacillinases present in *Acinetobacter* (Procop et al., 2017; Woodford et al., 2006). Susceptibilities to imipenem and meropenem were evaluated by disk diffusion method (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019). For this study, a total of 79 carbapenem-resistant *A. baumannii*, one isolate per patient, from 26 different hospitals in Brazil, were selected based on different *Apal*-pulsed field gel electrophoresis (PFGE) profiles (Seifert et al., 2005) and modified three-loci sequence typing (m3LST) (Martins et al., 2016).

Antimicrobial resistance and clonality of such isolates were previously characterized (Camargo et al., 2020).

2.2. Whole Genome Sequencing

Total genomic DNA was extracted by using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. Following quantification and qualification of extracted DNA (Qubit, Thermo Fisher, Waltham, USA), libraries were prepared with the Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina, San Diego, CA) following Illumina NextSeq 500 desktop sequencing, using the NextSeq 500/500 high-output kit version 2 (300 cycles, Illumina) at 2 × 150 cycles. Raw reads were analyzed for quality control parameters, trimmed and de novo assembled (coverage average depth of 330×) with the Spades algorithm (v.5.12.0.0), and submitted to web-based platforms for definitive species identification using the Ribosomal Multi-locus Sequence Typing (rMLST) (<https://pubmlst.org/rmlst/>) database. Sequence type (Pasteur Scheme) was inferred from the wgMLST database. Fasta files were imported into a local BioNumerics v.7.6.2 database and ribosomal RNA protein codifying sequences were extracted and compared in nucleotides (nt) and aminoacids (aa) sequence contents. After extraction of all codifying sequences of ribosomal RNA proteins from the assembled genomes, nt and aa comparison was carried out by using the ST79 strain AB030 (NZ_CP009257.1) as reference.

2.3. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry

Bacterial proteins were extracted with the Hijazin (Hijazin et al., 2012) protocol. Fresh (20h) bacterial cultures grown onto Tryptic Soy

Fig. 2. Dendrogram generated by SNPs analysis of 79 Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* sequenced by Illumina technology. The clonal complexes are indicated in the branches, and the color of full circles indicates CC1 (blue), CC15 (green), CC25 (red), CC79 (magenta) or singletons (gray) (Institute Pasteur Scheme). The same isolates were submitted to MALDI-TOF MS and the collected peaks were used to generate a principal component analysis, which generated three clusters codified in blue ($n = 6$), red ($n = 23$) and green ($n = 50$) (see Fig. 3). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Agar plates (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) were suspended in 70% ethanol followed by precipitation and resuspension in 1:1 volume acetonitrile-formic acid solution. The resuspended proteins were placed onto at least two spots of a steel plate and then covered with 1 μ L of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution (Bruker Daltonik) and

air dried for 15 min. The proteins spectra were collected with a Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), in default Biotyper configuration (laser frequency of 60 Hz, ion source 1 voltage of 20 kV, ion source 2 voltage of 18.15 kV, and mass range from 2000 to 20,000 kDa). For Principal Component Analysis (PCA), spectra

Fig. 3. Dendrogram of 79 *Acinetobacter baumannii* generated based on MALDI TOF MS peaks analyzed by PCA using the hierarchical method with correlation distance measure and average linkage. Same colors are represented in the bottom of figure.

data were imported in FlexAnalysis Software (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) and the BioTyper PCA Creation Standard Method was employed by using the default configurations (lower and upper mass band defined at 3000 and 15,000, respectively, with the resolution set at 2, with an automatically determined number of principal components). Next, the hierarchical method using the correlation distance measure and average linkage algorithm was employed to generate a dendrogram. Based on the main branches of this dendrogram, isolates were classified as belonging to three different clusters, indicated by green, blue, or red colors.

3. Results

All evaluated isolates confirmed the identification of *A. baumannii* according to the rMLST tool based on WGS.

Analysis of ribosomal-coding genes extracted from genomes identified mutations associated with clonal complexes (Fig. 1). However, the aa-deduced sequences were the same among the isolates, independently of clonal complexes, except for 3 missense mutations in the *rpsH* gene (which codifies the S8 ribosomal protein): G154A (Ala51Thr) in 21 isolates, all of them belonging to CC15; A210T (Lys70Asn) in one isolate also belonging to CC15 and C250T (Leu83Phe) in one isolate of CC1.

As seen in Fig. 2, most of the isolates were identified as belonging to clonal complexes CC1 ($n = 21$), CC15 (22), CC25 (11), and CC79 (22). Three singleton isolates belonging to sequence types ST49, ST151, and ST163 were also identified by WGS.

Based on the peaks generated by MALDI-TOF-MS, the data were analyzed by principal component analysis (PCA) generating the dendrogram presented in Fig. 3. Based on the PCA data, three major groups were identified; however, they did not correlate with clonal complexes (as indicated in the bottom of Fig. 2).

Taken together, our results indicate that MALDI-TOF-MS was not able to identify the clonal complexes of CRAB high-risk clones.

4. Discussion

Mutations in the ribosomal protein sequences were associated with clonal complexes in high-risk clones of carbapenem-resistant *A. baumannii* predominant in Brazil; otherwise, since most of them were synonymous, MALDI-TOF MS was not able to identify such differences.

Redundant mutations were observed, and they do correlate with the clonal complexes identified by the Institute Pasteur MLST Scheme. This indicates that the evolution of CRAB lineages and their ribosomal proteins are convergent. However, analyzing the ribosomal proteins nt and predicted aa sequences, we observed that most of the mutations were identified as silent ones. This could explain the MALDI-TOF results, since the most abundant proteins detected in the MALDI-TOF methodology are ribosomal proteins. The only three missense mutations leading to aa changes were observed in 30S ribosomal protein S8, a protein that binds directly to the 16S rRNA central domain and helps to coordinate the assembly with the 30S ribosomal subunit (<https://string-db.org/network/62977.ACIAD0304>). Since ribosomal proteins are essential for organism survival, the presence of synonymous mutations is not totally unexpected; mutations leading to aa changes may play an unfavorable role in organism survival, leading them to be negatively selected over time.

A previous study conducted in a single hospital suffering from a carbapenem resistant *A. baumannii* outbreak successfully clustered the clones determined by ribotyping with MALDI-TOF MS methodology (Mencacci et al., 2013). However, another study failed to identify such a relationship (Sousa et al., 2015), in line with our results. Due to the range of protein sizes analyzed with the Bruker Biotyper, limited by the time-of-flight decurrent of the length of its vacuum tube, only proteins ranging from m/z 2000 to 20,000 are analyzed in Bruker Biotyper equipment. Not surprisingly, the focus of this equipment in identifying

organisms' species limits its ability to comprehensively analyze the whole protein contents that could be associated with clonality.

Still with this limitation, a true revolution in clinical microbiology happened since the introduction of MALDI-TOF MS in routine laboratories, mainly due to the rapid, costless, and accurate identification of bacterial and fungal pathogens in clinical settings (Angeletti, 2017), leading to an improvement in patients' care and costs associated with nosocomial infections (Mellmann et al., 2008). Besides the fast and assertive identification of microbial pathogens, attempts to extend the use of MALDI-TOF MS in clinical routine have been described. Most of them focus on the fast performance of antimicrobial resistance by detecting the antimicrobial substrate peak and its absence after bacterial degradation caused by enzymatic degradation of antibiotics (Sanguinetti and Posteraro, 2016). But some authors report that this methodology can also be employed for bacterial typing, namely, *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* sequence type 37 genotype (Li et al., 2018), high-risk clones of *Pseudomonas aeruginosa* (Cabrolier et al., 2015) or vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (Freitas et al., 2017).

Besides the plethora of methods currently available for typing *Acinetobacter baumannii* (Rafei et al., 2014), unfortunately our data showed that MALDI-TOF MS by using the Bruker Biotyper cannot be employed for such aims, because diversity in ribosomal proteins does not go through the nucleotides sequences. Investigations on equipment collecting a wider range of proteins analyzed are warranted to improve *Acinetobacter* typing with fast, cheap, and accurate methods.

Data availability

The whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accessions SAMN14911831 to SAMN14911908.

Ethics

The present study was approved by the Scientific Technical Council of Instituto Adolfo Lutz (CTC 07-K/2018) and Local Ethics Committee (CAAE 23482719.5.0000.0059).

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

This study was supported by the grant number 2017/16988-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. CHC has received Productivity Research Fellows from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

We thank the team of curators of the Institute Pasteur *Acinetobacter* MLST system for curating the data and making them publicly available at <http://pubmlst.org/abaumannii/>.

References

- Angeletti, S., 2017. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. J. Microbiol. Methods 138, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>.
- Cabrolier, N., Sauguet, M., Bertrand, X., Hocquet, D., 2015. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. J. Clin. Microbiol. 53, 1395–1398. <https://doi.org/10.1128/JCM.00210-15>.
- Camargo, C.H., Cunha, M.P.V., de Barcellos, T.A.F., Bueno, M.S., de Bertani, A.M.J., dos Santos, C.A., Nagamori, F.O., Takagi, E.H., Chimara, E., de Carvalho, E., Tiba-Casas, M.R., 2020. Genomic and phenotypic characterisation of antimicrobial resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* hyperendemic clones CC1, CC15, CC79 and CC25. Int. J. Antimicrob. Agents 56, 106195. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106195>.
- Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., Wolk, D.M., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine

- practice of clinical microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 26, 547–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S29.
- Fortaleza, C.M.C.B., Padoveze, M.C., Kiffer, C.R.V., Barth, A.L., Carneiro, I.C.D.R.S., Giamberardino, H.I.G., Rodrigues, J.L.N., Santos Filho, L., de Mello, M.J.G., Pereira, M.S., Gontijo Filho, P.P., Rocha, M., Servolo de Medeiros, E.A., Pignatari, A. C.C., 2017. Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. J. Hosp. Infect. 96, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.03.024>.
- Freitas, A.R., Sousa, C., Novais, C., Silva, L., Ramos, H., Coque, T.M., Lopes, J., Peixe, L., 2017. Rapid detection of high-risk *Enterococcus faecium* clones by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 87, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.12.007>.
- Hijazin, M., Alber, J., Lämmler, C., Weitzel, T., Hassan, A.A., Timke, M., Kostrzewa, M., Prenger-Berninghoff, E., Zschöck, M., 2012. Identification of trueperella (*Arcanobacterium*) bernardiae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis and by species-specific PCR. J. Med. Microbiol. 61, 457–459. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.035774-0>.
- Li, R., Xiao, D., Yang, J., Sun, S., Kaplan, S., Li, Z., Niu, Y., Qiang, C., Zhai, Y., Wang, X., Zhao, X., Zhao, B., Welker, M., Pincus, D.H., Jin, D., Kamboj, M., Zheng, G., Zhang, G., Zhang, J., Tang, Y.W., Zhao, J., 2018. Identification and characterization of *Clostridium difficile* sequence type 37 genotype by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. <https://doi.org/10.1128/JCM.01990-17>.
- Marf-Almirall, M., Cosgaya, C., Higgins, P.G., Van Assche, A., Telli, M., Huys, G., Lievens, B., Seifert, H., Dijkshoorn, L., Roca, I., Vila, J., 2017. MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group revisited: inclusion of the novel *A. seifertii* and *A. dijkshoorniae* species. Clin. Microbiol. Infect. 23 <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.020>, 210.e1–210.e9.
- Marra, A.R., Camargo, L.F., Pignatari, A.C., Sukienik, T., Behar, P.R., Medeiros, E.A., Ribeiro, J., Girão, E., Correa, L., Guerra, C., Brites, C., Pereira, C.A., Carneiro, I., Reis, M., de Souza, M.A., Tranchesi, R., Barata, C.U., Edmond, M.B., Group, B.S.S., 2011. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. J. Clin. Microbiol. 49, 1866–1871. <https://doi.org/10.1128/JCM.00376-11>.
- Martins, N., Picão, R.C., Cerqueira-Alves, M., Uehara, A., Barbosa, L.C., Riley, L.W., Moreira, B.M., 2016. A new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clones. Infect. Genet. Evol. 42, 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.031>.
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., Dunn, J., Hall, G., Wilson, D., Lasala, P., Kostrzewa, M., Harmsen, D., 2008. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. J. Clin. Microbiol. 46, 1946–1954. <https://doi.org/10.1128/JCM.00157-08>.
- Mencacci, A., Monari, C., Leli, C., Merlini, L., De Carolis, E., Vella, A., Cacioni, M., Buzi, S., Nardelli, E., Bistoni, F., Sanguinetti, M., Vecchiarelli, A., 2013. Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 51, 603–606. <https://doi.org/10.1128/JCM.01811-12>.
- Procop, G.W., Church, D.L., Hall, G.S., Janda, W.M., Koneman, E.W., Schreckenberger, P. C., Woods, G.L., 2017. Koneman's Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott-Raven Publishers.
- Rafei, R., Kempf, M., Eveillard, M., Dabboussi, F., Hamze, M., Joly-Guillou, M.L., 2014. Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii*. Future Microbiol. <https://doi.org/10.2217/FMB.14.63>.
- Rafei, R., Osman, M., Dabboussi, F., Hamze, M., 2019. Update on the epidemiological typing methods for *Acinetobacter baumannii*. Future Microbiol. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0134>.
- Rossi, F., 2011. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. Clin. Infect. Dis. 52, 1138–1143. <https://doi.org/10.1093/cid/cir120>.
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., 2016. Mass spectrometry applications in microbiology beyond microbe identification: progress and potential. Expert Rev. Proteom. 13, 965–977. <https://doi.org/10.1080/14789450.2016.1231578>.
- Sauget, M., Valot, B., Bertrand, X., Hocquet, D., 2017. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? Trends Microbiol. 25, 447–455. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.006>.
- Seifert, H., Dolzani, L., Bressan, R., van der Reijden, T., van Strijen, B., Stefanik, D., Heersma, H., Dijkshoorn, L., 2005. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 43, 4328–4335. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4328-4335.2005>.
- Sousa, C., Botelho, J., Grosso, F., Silva, L., Lopes, J., Peixe, L., 2015. Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones under routine experimental conditions. Front. Microbiol. 6, 481. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00481>.
- Woodford, N., Ellington, M.J., Coelho, J.M., Turton, J.F., Ward, M.E., Brown, S., Amyes, S.G., Livermore, D.M., 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int. J. Antimicrob. Agents 27, 351–353. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>.

Genomic and phenotypic characterisation of antimicrobial resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* hyperendemic clones CC1, CC15, CC79 and CC25

Carlos Henrique Camargo^{a,b,*}, Marcos Paulo Vieira Cunha^c, Thays Almeida Franco de Barcellos^{a,b}, Mariana Sardinha Bueno^{a,b}, Amanda Maria de Jesus Bertani^a, Carla Adriana dos Santos^a, Filipe Onishi Nagamori^a, Elizabeth Harumy Takagi^a, Erica Chimara^a, Enéas de Carvalho^d, Monique Ribeiro Tiba-Casas^a

^a Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil

^b Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^c Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^d Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Illumina
Polymyxin resistance
Pandrug resistance
Molecular epidemiology
Antimicrobial resistance

ABSTRACT

Dissemination of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) is mainly driven by the spread of clonal lineages. High frequencies of CRAB are reported in South America, and clonal complexes CC1, CC15, CC79 and CC25 are predominant. A total of 79 non-redundant CRAB recovered from 26 Brazilian hospitals were selected for antimicrobial susceptibility testing by microdilution and whole-genome sequencing (WGS). Multilocus sequence typing (MLST), acquired antimicrobial resistance genes and phylogeny based on high-quality SNPs were extracted from WGS data. XDR (86.1%), MDR (12.7%) and one PDR isolate from CC15 (1.3%) were identified. Colistin resistance was more frequent in CC25 isolates ($P < 0.01$). Prevalence of CC79 ($n = 22$; 27.8%) CC1 ($n = 21$; 26.6%), CC15 ($n = 21$; 26.6%) and CC25 ($n = 12$; 15.2%) was observed. Regarding carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases (CHDLs), *bla*_{OXA-23} was frequently detected in CC1, CC15 and CC25 isolates, whereas *bla*_{OXA-72} was the most frequent CHDL in CC79 isolates [$n = 12/22$ (54.5%); $P < 0.01$]. High-quality SNP analysis correlated well with sequence type and revealed that CRAB clones are highly conversed and present some clone-specific resistance determinants. This study provides essential information to understand the antimicrobial resistance patterns of CRAB in Brazilian hospitals, where hyperendemic XDR-CRAB clones are disseminated. Phenotypic and genomic analysis of CRAB recovered from Brazilian hospitals revealed the predominance of XDR phenotype in the majority of international clonal complex CC79, CC1, CC15 and CC25. Dissemination of specific CRAB lineages in Brazil is suggested to be driven by their resistance determinants under antimicrobial selective pressure.

© 2020 Elsevier Ltd and International Society of Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) is one of the most frequent multidrug-resistant opportunistic pathogens causing infections [1,2]. The US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) lists it as one of the pathogens with a threat level of urgent [3].

CRAB has emerged in the last few decades and the spread of clonal lineages is well known to be associated with specific resistance determinants [4,5]. In Europe, international clones IC1 and IC2, corresponding to clonal complexes CC1 and CC2 (according to the Institut Pasteur scheme) are predominant [6–8]. In Brazil, a continental country in which hyperendemic rates of CRAB are reported [9,10], a different scenario is known, with the predominance of clonal complexes CC1/IC1, CC15/IC4, CC25/IC7 and CC79/IC5 [11]. Different resistance patterns are observed in these clonal lineages [5,12], but the predominance of OXA-23-, OXA-24/40- and OXA-143-like carbapenemases is well documented [11]. Indeed, in in vitro models, CC79/IC5 strains were shown to be

* Corresponding author. Present address: Instituto Adolfo Lutz, Centro de Bacteriologia, Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais, Avenida Dr Arnaldo, 351 - 9º Andar, Pacaembú, São Paulo-SP, Brazil.

E-mail address: carlos.camargo@ial.sp.gov.br (C.H. Camargo).

more virulent than other clones [13]. Although several studies have reported the epidemiology of CRAB in Brazil, a comprehensive analysis of such isolates is lacking. Whole-genome sequencing (WGS) has been elected the state-of-art methodology for analysis of bacterial genomes [8,14,15]. WGS has clarified the understanding of antimicrobial resistance gene (ARG) spread among *Acinetobacter* isolates in the hospital environment, elucidating the role of mobile genetic elements (MGEs) involved in the acquisition of these resistance determinants [16,17]. Resistance to carbapenems, aminoglycosides, tetracycline and even polymyxin can result from the acquisition of ARGs in MGEs, namely OXA-type carbapenemases, aminoglycosides-modifying enzymes (AMEs), *tet* genes and *mcr*-like genes, respectively [18].

Through a deep genomic analysis of CRAB clinical isolates recovered from different institutions, this study aimed to evaluate their antimicrobial susceptibility profile, their genetic relationship and the resistome of prevalent high-risk clones in Brazil.

2. Materials and methods

As a public health regional reference laboratory, Adolfo Lutz Institute (São Paulo, Brazil) receives clinical isolates for identification, antimicrobial susceptibility testing (AST) and molecular detection of resistance determinants on an ongoing and voluntary basis.

2.1. Selection of bacterial isolates and antimicrobial susceptibility testing

A total of 79 CRAB from 26 Brazilian hospitals presenting different *Apal*-digested pulsed-field gel electrophoresis (*Apal*-PFGE) pulsotypes [19] were selected to perform AST by minimum inhibitory concentration (MIC) determination using a commercial system (Sensititre; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) or in-house (for polymyxin B and colistin; Sigma) broth microdilution [20]. The results were interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2018 breakpoints. The resistance patterns of multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) and pandrug resistant (PDR) were determined according to an international classification [21].

2.2. Whole-genome sequencing

High-quality total DNA was extracted using a Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. After quantification and qualification of extracted DNA (Qubit; Thermo Fisher Scientific), libraries were prepared with a Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) following Illumina NextSeq 500 desktop sequencing using a NextSeq 500/500 High-Output Kit v.2 (300 cycles; Illumina Inc.) at 2 × 151 cycles.

2.3. Data analysis

Raw reads were analysed for quality control parameters, trimmed and de novo assembled with the SPAdes algorithm v.5.12.0.0 and submitted to web-based platforms for definitive species identification using the Ribosomal Multilocus Sequence Typing (rMLST) (<https://pubmlst.org/rmlst/>) database. ARGs and sequence types (STs) were sought using the ResFinder and MLST databases from the Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomic epidemiology.org/>), respectively, according to the Institut Pasteur scheme. High-quality single nucleotide polymorphisms (SNPs) were called using mpileup, part of SAMtools v.0.1.18 [22], from assembled genomes and a phylogenetic tree based on the concatenated alignments was built using CSI Phylogeny 1.4 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>) [23]. The genome of

A. baumannii AB030 (GenBank accession no. **CP009257.1**) was included as a reference. The Newick-generated file was uploaded on the Microreact platform [24] along with metadata for tree visualisation. SPSS Statistics v.17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was employed for χ^2 analysis, and a *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

The 79 CRAB isolates submitted to AST and WGS were recovered mainly from invasive sources (blood, urine, cerebrospinal fluid) (*n* = 48; 60.8%), tracheal secretion (*n* = 20; 25.3%) or colonisation (surveillance swabs) (*n* = 3; 3.8%); 8 isolates (10.1%) did not have their source assigned in these three categories (diversified secretion or skin infections). Overall, the highest susceptibility rates were observed for minocycline (98.7%), doxycycline (83.5%), polymyxin B (83.5%) and colistin (78.5%) (Table 1).

The AST patterns revealed a predominance of XDR isolates (*n* = 68; 86.1%), followed by MDR (*n* = 10; 12.7%) and 1 PDR isolate (1.3%).

Most of the isolates were representative of CC79 (ST79 and ST730) (*n* = 22; 27.8%), CC1 (ST1 and ST20) (*n* = 21; 26.6%), CC15 (ST15 and the novel ST1447) (*n* = 21; 26.6%) or CC25 (ST25 and the novel ST1448) (*n* = 12; 15.2%). Only three isolates (3.8%) did not belong to the Brazilian endemic clones of CRAB, including ST49 (*n* = 1), ST151 (*n* = 1) and ST163 (*n* = 1). Two novel alleles, and consequently two novel sequence types, were described. The first novel sequence type (ST1447) presents the allelic profile *cpn60* 6, *fusA* 6, *gltA* 8, *pyrG* 103 (new), *recA* 3, *rplB* 5, *rpoB* 4 and is a single-locus variant (SLV) of ST15 and thus belongs to CC15. The second novel sequence type (ST1448) is a SLV of ST25, belonging to CC25, and presents the allelic profile *cpn60* 3, *fusA* 3, *gltA* 2, *pyrG* 4, *recA* 7, *rplB* 114 (new), *rpoB* 4 (Institut Pasteur scheme).

AST results showed differences among the main clonal complexes detected in this study (Table 2). Colistin resistance was detected in 17 isolates (21.5%), being more frequent in CC25 isolates (*P* < 0.01).

A diversity of acquired ARGs was detected in the studied isolates. Regarding the carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases (CHDLs), the *bla*_{OXA-23} gene was frequently detected in CC1 (*n* = 21/21; 100%), CC15 (*n* = 20/21; 95.2%) and CC25 (*n* = 11/12; 91.7%), inserted into a Tn2008 element located in the chromosome (in 49 isolates). The *bla*_{OXA-72} gene was the most frequent in CC79 isolates (*n* = 12/22, 54.5%; *P* < 0.01), always associated with XerC/XerD recombination sites located in plasmids in all but one isolate. Two isolates presented the *bla*_{OXA-253} gene, one from CC15 and one from CC25. This determinant was associated with XerC/XerD sites upstream and downstream of the gene. In the strain belonging to ST15, namely 60_606_16, it was possible to verify that the gene was harboured in a plasmid.

Genes encoding the AMEs *aac*(3)-Ia, *aacA4* and *aph*(3')-Ic and the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *aac*(6)-Ib-cr were more frequently identified in CC1 isolates. Conversely, the AME gene *aph*(3')-VIa and the macrolide ARGs *msr*(E) and *mph*(E) were less frequently detected in CC1 isolates. The *bla*_{TEM-1A} gene was detected exclusively in CC79 isolates (*n* = 22/22; 100%); *dfpA1* (*n* = 22/22; 100%) and *floR* (*n* = 19/22; 86.4%) encoding trimethoprim and phenicol resistance, respectively, were more frequent in CC79 isolates. However, the *tet*(B) gene, which confers tetracycline resistance, was more frequently detected in CC25 isolates (*n* = 11/12; 91.7%) (Table 3). In the single isolate resistant to minocycline, the *tet*(B) gene was inserted in a Tn6172-like transposon, associated with the resistance genes *sul2* (sulfamethoxazole), *strA* and *strB* (streptomycin). In this transposable element, an ISCR2 copy, beyond *glmM* and *arsR* genes (which encode a phosphoglucosamine mutase and a transcription regulator of ArsR family, re-

Table 1Antimicrobial susceptibility rates determined by broth microdilution for 79 *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Brazil.

Antimicrobial agent	Susceptibility rate [n (%) of isolates]			MIC ₅₀ /MIC ₉₀ (mg/L)
	Susceptible	Intermediate	Resistant	
AK	6 (7.6)	5 (6.3)	68 (86.1)	>32/>32
SAM	4 (5.1)	11 (13.9)	64 (81.0)	32:16/64:32
FEP	0	1 (1.3)	78 (98.7)	>16/>16
CTX	0	0	79 (100)	>32/>32
CAZ	0	1 (1.3)	78 (98.7)	>16/>16
CIP	0	1 (1.3)	78 (98.7)	>2/>2
COL	62 (78.5)	0	17 (21.5)	≤0.25/>4
DOR	1 (1.3)	0	78 (98.7)	>4/>4
DOX	66 (83.5)	1 (1.3)	12 (15.2)	≤2/16
GEN	21 (26.6)	10 (12.7)	48 (60.8)	>8/>8
IMI	0	0	79 (100)	>8/>8
LEV	0	14 (17.7)	65 (82.3)	>8/>8
MEM	0	0	79 (100)	>8/>8
MIN	78 (98.7)	0	1 (1.3)	≤2/≤2
TZP	0	0	79 (100)	>64:4/>64:4
POL	66 (83.5)	0	13 (16.5)	≤0.25/8
SXT	10 (12.7)	0	69 (87.3)	>4:76/>4:76
TIM	0	0	79 (100)	>128:2/>128:2
TOB	49 (62.0)	3 (3.8)	27 (34.2)	4/>8

AK, amikacin; SAM, ampicillin/sulbactam; FEP, cefepime; CTX, cefotaxime; CAZ, cef-tazidime; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; DOR, doripenem; DOX, doxycycline; GEN, gentamicin; IMI, imipenem; LEV, levofloxacin; MEM, meropenem; MIN, minocycline; TZP, piperacillin/tazobactam; POL, polymyxin B; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; TIM, ticarcillin/clavulanate; TOB, tobramycin; MIC, minimum inhibitory concentration required to inhibit 50% and 90% of the isolates, respectively.

Table 2Antimicrobial resistance rates determined by broth microdilution among the main carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages (CC1, CC15, CC25 and CC79) recovered from different institutions in Brazil

Antimicrobial agent	CC1 (n = 21; 26.6%)		CC15 (n = 21; 26.6%)		CC25 (n = 12; 15.2%)		CC79 (n = 22; 27.8%)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
AK	17	81.0	19	90.5	10	83.3	19	86.4
SAM*	18	85.7	20	95.2	6	50	19	86.4
FEP	21	100	21	100	11	91.7	22	100
CTX	21	100	21	100	12	100	22	100
CAZ	21	100	21	100	11	91.7	22	100
CIP	21	100	20	95.2	12	100	22	100
COL	2	9.5	4	19.0	4	33.3	5	22.7
DOR	21	100	20	95.2	12	100	22	100
DOX*	1	4.8	1	4.8	9	75	1	4.5
GEN	20	95.2	4	19.0	4	33.3	17	77.3
IMI	21	100	21	100	12	100	22	100
LEV*	19	90.5	16	76.2	6	50	22	100
MEM	21	100	21	100	12	100	22	100
MIN	0	0	1	4.8	0	0	0	0
TZP	21	100	21	100	12	100	22	100
POL*	1	4.8	4	19.0	4	33.3	2	9.1
SXT*	19	90.5	14	66.7	12	100	22	100
TIM	21	100	21	100	12	100	22	100
TOB*	20	95.2	4	19.0	2	16.7	1	4.5
Antimicrobial resistance pattern ^a								
MDR	2	9.5	6	28.6	0	0	1	4.5
PDR	0	0	1	4.8	0	0	0	0
XDR	19	90.5	14	66.7	12	100	21	95.5

CC, clonal complex; AK, amikacin; SAM, ampicillin/sulbactam; FEP, cefepime; CTX, cefotaxime; CAZ, cef-tazidime; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; DOR, doripenem; DOX, doxycycline; GEN, gentamicin; IMI, imipenem; LEV, levofloxacin; MEM, meropenem; MIN, minocycline; TZP, piperacillin/tazobactam; POL, polymyxin B; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; TIM, ticarcillin/clavulanate; TOB, tobramycin; MDR, multidrug-resistant; PDR, pandrug-resistant; XDR, extensively drug-resistant.

NOTE: The three singleton isolates were not included.

^a Determined according to the classification of Magiorakos et al. [21].

* Denotes statistical significance by χ^2 test ($P < 0.05$).

spectively), was detected, showing high similarity with a region of plasmid pMC1.1 from an *A. baumannii* isolated in Bolivia [25].

High-quality SNP analysis showed four main branches in accordance with the Institut Pasteur scheme. The ST730 isolates clustered inside the CC79 branch, but indicated a phylogenetic derivation.

Some clone-specific resistance determinants could be easily identified, in accordance with the AST results (Fig. 1). One isolate presented non-susceptibility to all antimicrobial agents evaluated and harboured the resistance determinants *aac(6')-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{TEM-1B}*, *bla_{ADC-25}*, *sul2*, *tet(B)* and the efflux pumps genes *adeIKL*. This isolate was recovered

Table 3Distribution of antimicrobial resistance genes (ARGs) among the main carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages (CC1, CC15, CC25 and CC79) recovered from different institutions in Brazil.

ARG	CC1 (n = 21; 26.6%)		CC15 (n = 21; 26.6%)		CC25 (n = 12; 15.2%)		CC79 (n = 22; 27.8%)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>aac(3)-Ia</i> *	12	57.1	0	0	0	0	3	13.6
<i>aacA4</i> *	21	100	1	4.8	0	0	0	0
<i>aadA1</i> *	10	47.6	0	0	0	0	22	100
<i>aph(3')-Ic</i> *	12	57.1	0	0	0	0	3	13.6
<i>aph(3')-VIa</i> *	3	14.3	16	76.2	10	83.3	19	86.4
<i>strA</i> *	4	19.0	2	9.5	10	83.3	17	77.3
<i>strB</i> *	4	19.0	2	9.5	10	83.3	18	81.8
<i>aac(3)-IIa</i>	0	0	1	4.8	2	16.7	0	0
<i>aac(6)-Iaa</i>	0	0	1	4.8	0	0	0	0
<i>aph(3'')-Ib</i>	0	0	1	4.8	1	8.3	0	0
<i>aph(6)-Id</i>	0	0	1	4.8	0	0	0	0
<i>aadB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>aph(6)-Ib</i>	0	0	0	0	1	8.3	0	0
<i>bla_{OXA-23}</i> *	21	100	20	95.2	11	91.7	12	54.5
<i>bla_{OXA-72}</i> *	0	0	0	0	3	25.0	10	45.5
<i>bla_{OXA-253}</i>	0	0	1	4.8	1	8.3	0	0
<i>bla_{TEM-1A}</i> *	0	0	0	0	0	0	22	100
<i>bla_{TEM-1B}</i>	0	0	1	4.8	1	8.3	0	0
<i>aac(6)-Ib-cr</i> *	21	100	1	4.8	0	0	0	0
<i>msr(E)</i> *	3	14.3	12	57.1	8	66.7	17	77.3
<i>mph(E)</i> *	3	14.3	12	57.1	8	66.7	17	77.3
<i>floR</i> *	3	14.3	0	0	0	0	19	86.4
<i>sul1</i> *	14	66.7	0	0	0	0	3	13.6
<i>sul2</i> *	5	23.8	10	47.6	11	91.7	22	100
<i>tet(B)</i> *	0	0	1	4.8	11	91.7	0	0
<i>tet(39)</i>	0	0	1	4.8	0	0	0	0
<i>dfra1</i> *	0	0	0	0	0	0	22	100

CC, clonal complex.

NOTE: The three singleton isolates were not included.

* Denotes statistical significance by χ^2 test ($P < 0.05$).

ered from an oncology patient with bloodstream infection and was classified as ST15.

4. Discussion

This study showed that specific antimicrobial resistance determinants are correlated with the main clusters of CRAB currently circulating in Brazil, likely indicating that the spread of such clones may be driven by antimicrobial selective pressure.

CRAB are reported as one of the priority agents to be fought in hospital settings. Bacteraemia due to *A. baumannii* presents the highest lethality rate among the bacterial agents in intensive care unit (ICU) patients with bloodstream infection [26]. Prompt and correct antimicrobial therapy is an independent factor for survival of patients with infections due to MDR and XDR *A. baumannii* [27].

The emergence and dissemination of XDR and even PDR strains among CRAB clones is well documented in Brazilian hospitals, mainly due to the spread of CC1, CC15 and CC79 lineages [5,11,28–30].

Knowledge of the resistance patterns is essential for directing empirical antimicrobial therapy. In this regard, we showed that the CRAB presented numerous co-resistances, as noted by the high prevalence of XDR strains among the isolates evaluated. Minocycline was universally the most active drug among all of the CRAB lineages evaluated, including the non-prevalent ST49 and two novel STs (ST1447, a SLV of ST15, and ST1448, a SLV of ST25) described for the first time in this study. However, the single PDR strain, belonging to ST15, was resistant to this drug, confirmed by in-house broth microdilution (MIC = 32 mg/L) and disk diffusion (14 mm).

Analysing several pulsotypes of prevalent clones from Brazil, we identified that polymyxins are still a good option for treatment of CRAB infections, with in vitro susceptibility rates of ~80%. Nevertheless, colistin and polymyxin B resistance was remarkably higher

in CC25 isolates ($P < 0.01$); CC25 isolates have been consistently reported in Latin America [31], although in lower frequencies than the CC1, CC15 or CC79. Attention should be paid to the possible future emergence of CC25 since polymyxins are one of the main treatment choices for severe infections [32,33], and a recent study from this region also identified colistin resistance among CC25 isolates in Bolivia [34]. Indeed, higher mortality rates were found to be associated with infections due to OXA-23-producing ST25 *A. baumannii* in an ICU in Brazil [13]. The fact that the CC25 isolates were mainly recovered from large centres of Sao Paulo State (metropolitan region of the Sao Paulo municipality, with more than 19 million inhabitants with more abundant referred services including higher complexity hospitals), we can speculate that colistin usage may be higher in such settings, and the selective pressure towards polymyxin-resistant CC25 is already ongoing. Indeed, genomic studies have shown that CC25 isolates present different virulence genes profile, and particular diversity, highlighting the genome plasticity of this clonal complex [35]. This still emerging finding certainly deserves further investigation, focusing on polymyxin usage in the centres where polymyxin-resistant CC25 isolates were detected.

The CHDL OXA-23 was the main carbapenemase found in this study, identified in all of the lineages evaluated. Spread of OXA-23 as the main determinant of carbapenem resistance in *A. baumannii* is well documented in Latin America [11,31] as in other regions of the world [36]. On the other hand, we identified a correlation between OXA-72 and CC79 strains, likely indicating a clonal expansion after the acquisition of this genetic determinant, which in our isolates was predominantly found in plasmids. In a previous study, also from Brazil but from a different region, Vasconcelos et al. [37] identified a prevalence of OXA-72-producing *A. baumannii* from CC79 isolates in different Brazilian hospitals, besides the emergence of *Acinetobacter pittii* in the Northern Region of Brazil. Possibly regional factors, such as climatic features, available

Fig. 1. Phylogenetic tree constructed based on high-quality single nucleotide polymorphisms (CSI Phylogeny) of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* recovered from clinical specimens in Brazil. Coloured circles represent the sequence type (Institut Pasteur scheme) based on seven housekeeping genes (pink = CC79; blue = CC1; green = CC15; red = CC25). Antimicrobial susceptibility testing results are shown for amikacin (AK), ampicillin/sulbactam (SAM), cefepime (FEP), cefotaxime (CTX), cef-tazidime (CAZ), ciprofloxacin (CIP), colistin (COL), doripenem (DOR), doxycycline (DOX), gentamicin (GEN), imipenem (IMI), levofloxacin (LEV), meropenem (MEM), minocycline (MIN), piperacillin/tazobactam (TZP), polymyxin B (POL), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), ticarcillin/clavulanate (TIM) and tobramycin (TOB), with red denoting resistance, green denoting susceptibility and yellow denoting intermediate susceptibility. Resistance patterns were determined according to the classification of Magiorakos et al. [21]. Antimicrobial resistance genes detected by whole-genome sequencing are presented in black (detected) or white (not detected) squares. CC, clonal complex.

antimicrobials, daily practices, patient and healthcare-associated complexities, and other still unknown factors could help explain such differences in a continental country like Brazil. Two CRAB isolates recovered from invasive (bloodstream infection and cerebrospinal fluid) infections in patients from Sergipe State, Northeast Region, belonging to ST15 and ST25 harboured the *bla*_{OXA-253} gene surrounded by XerC/XerD sites, recognised to be involved in antimicrobial resistance spread [38]. The *bla*_{OXA-253} gene was already detected in the Brazilian Northeast Region in different sequence types (including ST15 and ST25), but in a disseminated plasmid [39]. The same *bla*_{OXA} gene was reported in hospitals in Lima, Peru, a neighbouring country of Brazil, in recent years [40]. Different from previous reports in Brazilian isolates, *bla*_{OXA-231}, a *bla*_{OXA-143} variant, was not detected in our sampling, in accordance with the absence of ST107 in this study [29,41].

Besides the CHDL genes found in our study, genomic approaches allowed us to identify the resistome contributing to the MDR and XDR phenotypes observed in our sampling. We observed a positive correlation ($P < 0.01$) between the presence of the AME genes *aac(3)-Ia*, *aacA4* and *aph(3')-Ic* and isolates belonging to CC1, which presented the more pronounced resistance to tobramycin. Furthermore, we identified that the *bla*_{TEM-1} gene was associated with CC79 isolates, as well as the *dfrA1* and *sul2* genes, which encode resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole, respectively. The resistome *strA*, *strB*, *aadA1*, *aadB*, *aph(3')-Ia*, *ISAb1-ampC*, *bla*_{TEM-1A}, *sul2*, *floR* and *dfrA1* was recently detected in one ST15 CRAB from Bolivia, in a region with a predominance of CC25 [34].

Change in the distribution of CRAB clones is assumed to be explained as a result of antimicrobial exposure and selective pressure. In a hospital setting, we documented two remarkable shifts in the prevalence of CRAB clones over an 8-year period [5]. Larger studies identified the same patterns on a global scale [4]. In addition, introduction of international clones IC2 and IC3 was recently reported in Brazil [42] and other South American countries [40], reflecting the constant dynamics of transmission and highlighting the need for continuous surveillance of antimicrobial-resistant pathogens.

Since IC2 and IC3 are widespread in European and Asian countries, but not in our settings (until now, at least), continuous surveillance of antimicrobial-resistant *A. baumannii* is necessary to understand its distribution and to prevent the dissemination of emerging lineages.

In summary, AST and genomic analysis of a large and contemporary collection of CRAB recovered from 26 Brazilian hospitals revealed the predominance of XDR phenotype in the majority of international clonal complex CC79, CC1, CC15 and CC25. Dissemination of specific CRAB lineages in Brazil is suggested to be driven by their resistance determinants under antimicrobial selective pressure, which deserves continuous surveillance to avoid the emergence and dissemination of still non-prevalent clones with additional resistance markers. The reason for the success of specific clonal lineages remains to be uncovered. However, the different factors contributing to multidrug resistance vary considerably between different clonal complexes, between strains belonging to the same sequence type, and even between isolates related phylo-

genetically and epidemiologically characterised by more discriminative methods than MLST [17,43]. The genomic plasticity of this micro-organism facilitating the horizontal gene transfer of MGEs involved in the acquisition of these traits in a given environmental setting is essential to understand the dissemination of specific CRAB lineages.

Acknowledgment

The authors thank the team of curators of the Institut Pasteur *Acinetobacter* MLST system for curating the data and making them publicly available at <http://pubmlst.org/abaumannii/>.

Funding: This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grant no. 2017/16988-6]. CHC has received Productivity Research Fellows from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- Peleg AY, Paterson DL. Multidrug-resistant *Acinetobacter*: a threat to the antibiotic era. *Intern Med J* 2006;36:479–82. doi:10.1111/j.1445-5994.2006.01130.x.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:538–82. doi:10.1128/CMR.00058-07.
- US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Antibiotic resistance threats in the United States 2013. Atlanta, GA: CDC; 2013.
- Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 2010;5:e10034. doi:10.1371/journal.pone.0010034.
- Tavares LCB, De Vasconcellos FM, De Sousa WV, Rocchetti TT, Mondelli AL, Ferreira AM, et al. Emergence and persistence of high-risk clones among MDR and XDR *A. baumannii* at a Brazilian teaching hospital. *Front Microbiol* 2019;9:2898. doi:10.3389/fmicb.2018.02898.
- Pournaras S, Dafopoulou K, Del Franco M, Zarkotou O, Dimitroulia E, Protonotariou E, et al. Predominance of international clone 2 OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece, 2015: results of a nationwide study. *Int J Antimicrob Agents* 2017;49:749–53. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.01.028.
- Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41:11–19. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008.
- Holt K, Kenyon JJ, Hamidian M, Schultz MB, Pickard DJ, Dougan G, et al. Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1. *Microb Genom* 2016;2:e000052. doi:10.1099/mgen.0.000052.
- Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis* 2011;52:1138–43. doi:10.1093/cid/cir120.
- Fortaleza CMCB, Padoveze MC, Veiga Kiffer CR, Barth AL, Carneiro ICDRS, Giamberardino HIG, et al. Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. *J Hosp Infect* 2017;96:139–44. doi:10.1016/j.jhin.2017.03.024.
- Medeiros M, Limcopan N. Oxacillinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. *J Bras Patol e Med Lab* 2013;49:391–405. doi:10.1590/S1676-24442013000600003.
- Vasconcellos FM, Casas MR, Tavares LC, Garcia DO, Camargo CH. In vitro activity of antimicrobial agents against multidrug- and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol* 2017;66:98–102. doi:10.1099/jmm.0.000422.
- da Silva KE, Maciel WG, Croda J, Cayô R, Ramos AC, de Sales RO, et al. A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit. *PLoS One* 2018;13:e0209367. doi:10.1371/journal.pone.0209367.
- Salipante SJ, SenGupta DJ, Cummings LA, Land TA, Hoogstraal DR, Cookson BT. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *J Clin Microbiol* 2015;53:1072–9. doi:10.1128/JCM.03385-14.
- Levy SE, Myers RM. Advancements in next-generation sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2016;17:95–115. doi:10.1146/annurev-genom-083115-022413.
- Lean SS, Yeo CC. Small, enigmatic plasmids of the nosocomial pathogen, *Acinetobacter baumannii*: good, bad, who knows? *Front Microbiol* 2017;8:1547. doi:10.3389/fmicb.2017.01547.
- Cameranesi MM, Paganini J, Limansky AS, Moran-Barrio J, Salcedo SP, Viale AM, et al. Acquisition of plasmids conferring carbapenem and aminoglycoside resistance and loss of surface-exposed macromolecular structures as strategies for the adaptation of *Acinetobacter baumannii* CC104⁰/CC15⁰ strains to the clinical setting. *Microb Genom* 2020;6. doi:10.1099/mgen.0.000360.
- Durante-Mangoni E, Zarrilli R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. *Future Microbiol* 2011;6:407–22. doi:10.2217/fmb.11.23.
- 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;43:4328–35. doi:10.1128/JCM.43.9.4328-4335.2005.
- CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf [accessed 9 October 2020].
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;25:2078–9. doi:10.1093/bioinformatics/btp352.
- Kaas RS, Leekcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One* 2014;9:e104984. doi:10.1371/journal.pone.0104984.
- Argimón S, Abudahab K, Goater RJE, Fedosejev A, Bhai J, Glasner C, et al. Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microb Genomics* 2016;2:e000093. doi:10.1099/mgen.0.000093.
- Cerezales M, Xanthopoulou K, Wille J, Krut O, Seifert H, Gallego L, et al. Mobile genetic elements harboring antibiotic resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* isolates from Bolivia. *Front Microbiol* 2020;11:919. doi:10.3389/fmicb.2020.00919.
- Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* 2011;49:1866–71. doi:10.1128/JCM.00376-11.
- Leão AC, Menezes PR, Oliveira MS, Levin AS. *Acinetobacter* spp. are associated with a higher mortality in intensive care patients with bacteremia: a survival analysis. *BMC Infect Dis* 2016;16:386. doi:10.1186/s12879-016-1695-8.
- Moreira MG, Camargo CH, Vasconcellos FM, Barreto LM, Nobre V, Santos SG. Diversity of *bla*_{OXA-51} variants and its clonal complexes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in patients with ventilator-associated pneumonia. *J Glob Antimicrob Resist* 2017;9:94–5. doi:10.1016/j.jgar.2017.03.001.
- Camargo CH, Tiba MR, Saes MR, De Vasconcellos FM, Dos Santos LF, Romero EC, et al. Population structure analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Brazil reveals predominance of clonal complexes 1, 15, and 79. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:2545–7. doi:10.1128/AAC.02186-15.
- Romanin P, Palermo RL, Cavallini JF, Fávoro L dos S, De Paula-Petroli SB, Fernandes EV, et al. Multidrug- and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary hospital from Brazil: the importance of carbapenemase encoding genes and epidemic clonal complexes in a 10-year study. *Microb Drug Resist* 2019;25:1365–73. doi:10.1089/mdr.2019.0002.
- Rodríguez CH, Nastro M, Famiglietti A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Rev Argent Microbiol* 2018;50:327–33. doi:10.1016/j.RAM.2017.10.006.
- Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis* 2010;51:79–84. doi:10.1086/653120.
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clin Infect Dis* 2008;46:1121–2 author reply 1122. doi:10.1086/528867.
- Cerezales M, Xanthopoulou K, Wille J, Bustamante Z, Seifert H, Gallego L, et al. *Acinetobacter baumannii* analysis by core genome multi-locus sequence typing in two hospitals in Bolivia: endemicity of international clone 7 isolates (CC25). *Int J Antimicrob Agents* 2019;53:844–9. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.03.019.
- Sahl JW, Del Franco M, Pournaras S, Colman RE, Karah N, Dijkshoorn L, et al. Phylogenetic and genomic diversity in isolates from the globally distributed *Acinetobacter baumannii* ST25 lineage. *Sci Rep* 2015;5:15188. doi:10.1038/srep15188.
- Evans BA, Amey SG. OXA b-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:241–63. doi:10.1128/CMR.00117-13.
- Vasconcelos AT, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucarevski BR, et al. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;83:382–5. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.08.006.
- Cameranesi MM, Morán-Barrio J, Limansky AS, Repizo GD, Viale AM. Site-specific recombination at XerC/D sites mediates the formation and resolution of plasmid co-integrates carrying a *bla*_{OXA-58} and *TnaphA6*-resistance module in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* 2018;26:66. doi:10.3389/fmicb.2018.00066.
- De Sá Cavalcanti FL, Mendes-Marques CL, Vasconcelos CRDS, De Lima Campos T, Rezende AM, Xavier DE, et al. High frequency of OXA-253-producing *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:e01309-16. doi:10.1128/AAC.01309-16.

- [40] Levy-Blitchtein S, Roca I, Plasencia-Rebata S, Vicente-Taboada W, Velásquez-Pomar J, Muñoz L, et al. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru article. *Emerg Microbes Infect* 2018;7:119. doi:[10.1038/s41426-018-0127-9](https://doi.org/10.1038/s41426-018-0127-9).
- [41] Rodrigues-Costa F, Cayô R, Matos AP, Girardello R, Martins WMBS, Carrara-Marroni FE, et al. Temporal evolution of *Acinetobacter baumannii* ST107 clone: conversion of *bla*_{OXA-143} into *bla*_{OXA-231} coupled with mobilization of *ISAbal* upstream *occAB1*. *Res Microbiol* 2019;170:53–9. doi:[10.1016/j.resmic.2018.07.001](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.07.001).
- [42] Pagano M, Nunes LS, Niada M, Barth AL, Martins AF. Comparative analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* sequence types in southern Brazil: from the first outbreak (2007–2008) to the endemic period (2013–2014). *Microb Drug Resist* 2019;25:538–42. doi:[10.1089/mdr.2018.0262](https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0262).
- [43] Gaiarsa S, Batisti Biffignandi G, Esposito EP, Castelli M, Jolley KA, Brisse S, et al. Comparative analysis of the two *Acinetobacter baumannii* multilocus sequence typing (MLST) schemes. *Front Microbiol* 2019;10:930. doi:[10.3389/fmicb.2019.00930](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00930).

Detection of pandrug-resistant ST15 *Acinetobacter baumannii* causing bloodstream infection in an HSCT patient in Brazil

Mariana Sardinha Bueno^{1,2}, Maristela Pinheiro Freire²,
Marcos Paulo Vieira Cunha²,
Thays Almeida Franco de Barcellos^{1,2},
Amanda Maria de Jesus Bertani¹,
Carla Adriana dos Santos ¹, Erica Chimara¹,
Filipe Onishi Nagamori¹, Elizabeth Harummy Takagi¹,
Silvia Figueiredo Costa², Raquel Keiko de Luca Ito²,
Edson Abdala², Eneas de Carvalho³,
Monique Ribeiro Tiba-Casas¹ and
Carlos Henrique Camargo^{1,2*}

¹Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil; ²Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; ³Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author. E-mail: carlos.camargo@ial.sp.gov.br

Sir,
Infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* are responsible for high mortality rates¹ and appropriate antimicrobial therapy is essential for the successful treatment of these infections.² In Brazil, where hyperendemic rates of carbapenem-resistant *A. baumannii* are reported, polymyxins have been employed for the treatment of severe carbapenem-resistant *A. baumannii* infections, which can result in the emergence of resistance to this drug.³ Actually, treatment with polymyxin B is recognized as a risk factor for occurrence of colistin-resistant *A. baumannii* and the role of combined therapy affecting the mortality has not been totally elucidated so far.⁴

We report the case of a patient with haematological malignancies who underwent autologous HSCT and who had bloodstream infection due to pandrug-resistant (PDR) *A. baumannii* (including *A. baumannii* genomic characterization).

This study was approved by the Scientific Technical Advisory Board of Instituto Adolfo Lutz (Process CTC 07-K/2018) and the Local Ethics Committee (CAAE 23482719.5.0000.0059).

A male patient in his mid-sixties, with a diagnosis of multiple myeloma kappa-producer International Staging System (ISS) III, was admitted to hospital (Day 0) for an autologous HSCT through peripheral blood progenitor cell infusion. HSCT was performed on

Day 7 and neutrophil recovery occurred on Day 19. On Day 22, the patient was referred to an ICU due to hypernatraemia. At that time, a rectal surveillance culture became positive for carbapenem-resistant *A. baumannii*. Two days later, the patient was diagnosed with pneumonia and treated with polymyxin B, meropenem and amikacin for 7 days. Twelve days later (Day 36), the patient had worse respiratory parameters and haemodynamic instability. Polymyxin B, meropenem, linezolid and anidulafungin were introduced. A CT scan showed new bilateral parenchyma consolidations. Blood cultures and a central venous catheter culture were positive for *Candida parapsilosis* and carbapenem- and polymyxin-resistant *A. baumannii*. Endocarditis was ruled out through trans-oesophageal echocardiography. A tracheal aspiration cultured on Day 43 was still positive for *A. baumannii* with the same susceptibility profile. From Days 44 to 51, the patient partially recovered; however, on Day 51, fever returned and new septic shock and blood cell dyscrasia occurred, leading to death 4 days later.

A blood culture performed on Day 36 flagged positive for carbapenem- and polymyxin B-resistant *A. baumannii* (isolate 414.17), which was also found to be non-susceptible to aminoglycosides, quinolones, other β -lactams, colistin, tetracyclines and trimethoprim/sulfamethoxazole, and, therefore, classified as PDR (Table 1). Whole-genome shotgun sequencing was performed using v2 chemistry with paired-end, 2 $\times$ 200 bp reads on a HiSeq platform (Illumina, USA). Reads were *de novo* assembled using SPAdes software (v.3.12.0). Isolate 414.17 was identified as *A. baumannii*, ST15 (Pasteur Scheme).

Resistance genes were identified by using the CARD (<https://card.mcmaster.ca/>) and ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) online databases. Point mutations conferring resistance to quinolones (*gyrA/B* and *parC/E*) were detected, comparing the 414.17 genome with the *A. baumannii* ATCC 17978 genome. To determine mutations in the *pmrCAB* operon and *lpxACD* genes, these genes were compared with corresponding coding sequences in the genomes of polymyxin-susceptible ST15 *A. baumannii* strains from our collection (data not shown). Aminoglycoside resistance could be attributed to genes encoding *N*-acetyltransferase-type aminoglycoside-modifying enzymes [*aac(6')*-Iaa and *aac(3)-IIa*]; *strA* and *strB* genes, which confer resistance to streptomycin, were also detected. Resistance to β -lactams was also mediated by enzymatic mechanisms, nominally due to the presence of the carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase oxacillinase OXA-23, whose gene was inserted downstream of one copy of ISAb1 and upstream of an AAA ATPase-coding region, i.e. in a Tn2008a transposon;⁵ *bla*_{TEM-1B} was also detected. Resistance to sulfamethoxazole and tetracyclines can be explained by the presence of *sul2* and *tet(A/B)* genes, respectively.

Quinolone resistance was attributed to mutations in DNA gyrase *gyrA* and topoisomerase *parC* genes (Table 1). Mutations in regions related to polymyxin resistance were found in *pmrB* (D79E) and *lpxD* (A273G) genes. In addition, other interspecies

Table 1. Antimicrobial susceptibility profile determined by Sensititre (Thermo Scientific) (unless otherwise stated) for PDR *A. baumannii* 414.17

Antimicrobials and MIC in mg/L (category)	Resistance genes	Mutations
Aminoglycosides		
amikacin >32 (R)		—
gentamicin >8 (R)	<i>aac(6′)-Ian</i>	
tobramycin >8 (R)	<i>aac(3)-IIa</i>	
netilmicin ^a >256 (R)		
Quinolones		
ciprofloxacin >2 (R)	—	<i>gyrA</i> (S83L)
levofloxacin 8 (R)		<i>parC</i> (S80L)
β-Lactams ^a		
ampicillin/		—
sulbactam >64/32 (R)		
cefepime >16 (R)		
cefotaxime >32 (R)		
ceftazidime >16 (R)		
ceftriaxone ^b >32 (R)	<i>bla_{OXA-23}</i>	
doripenem >4 (R)	<i>bla_{TEM-1B}</i>	
imipenem >8 (R)		
meropenem >8 (R)		
piperacillin/		
tazobactam >64/4 (R)		
ticarcillin/		
clavulanate >128/2 (R)		
Polymyxins ^c		
polymyxin B 16 (R)	—	<i>pmrB</i> (D79E)
colistin >4 (R)		<i>lpxD</i> (A273G)
Tetracyclines		
tetracycline ^b 16 (R)	<i>tet(B)</i>	—
minocycline ^c 32 (R)		
doxycycline 16 (R)		
Folate pathway antagonist		
trimethoprim/	<i>sul2</i>	—
sulfamethoxazole >76/4 (R)		

MIC values are categorized as susceptible, intermediate or resistant (R) following CLSI M100-S30 breakpoints (available at <http://em100.edapti.vedocs.net/dashboard.aspx>). Antimicrobial resistance genes and mutations associated with resistance phenotype are also presented.

^a*bla_{ADC-25}* and *bla_{OXA-51}* genes were also detected, but not in association with an IS.

^bDetermined by Etest.

^cDetermined by in-house broth microdilution.

antimicrobial efflux pump genes [*tet(R)*, *adeL*, *adeK*, *adeI*, *adeS*, *adeN* and *adeF*] were also identified.

Three plasmids of approximately 138, 78 and 10 kb were identified by S1-PFGE, but we were not able to assemble those plasmids or to identify the presence of resistance genes in them using the Illumina short reads.

MDR carbapenemase-producing CC15 *A. baumannii* are endemic in South America.^{6,7} However, studies involving genomic characterization of this clonal group are scarce. Chagas *et al.*⁸

described the genome of an MDR ST15 *A. baumannii* isolate (CCBH5233) isolated in Rio de Janeiro in 2009. Comparing the resistome of our isolate with CCBH5233, both strains carry the same β-lactamases (*bla_{OXA-23}* and *bla_{TEM-1B}*), besides intrinsic chromosomal β-lactamases *bla_{OXA-51}* and *bla_{ADC-25}* (AmpC) and the *aac(3)-IIa* and *sul2* genes. In addition, the same mutations in *gyrA* and *parC* were observed. Conversely, the CCBH5233 strain does not have *tet(B)* or mutations in *pmrCAB* or *lpxACD*, differing from the PDR isolate described herein.

In this study, we report a case of bloodstream infection due to PDR *A. baumannii* in an oncological patient who underwent stem cell transplantation. Transplanted patients are at risk for developing bacterial infections and infections due to MDR and XDR strains are frequently reported in Brazil. However, PDR strains haven't been reported so far in this at-risk population. Unexpectedly, molecular typing revealed that it belonged to ST15, an usual high-risk clone associated with less pronounced resistance rates in our setting. Considering that ST15 has been consistently identified among carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates from Latin America surveys,⁹ attention should be paid to this new potentially emerging pathogen with a PDR phenotype.

GenBank accession number

This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number JAATOE000000000. The version described in this paper is version JAATOE010000000.

Funding

This study was supported by grant #2017/16988-6 [São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, Brazil]. C.H.C. has received Productivity Research Fellows from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Transparency declarations

None to declare.

References

1 Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC *et al.* Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 1866–71.

2 Freire MP, de Oliveira Garcia D, Garcia CP *et al.* Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. *Clin Microbiol Infect* 2016; **22**: 352–8.

3 Lima WG, Alves MC, Cruz WS *et al.* Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: a huge public health threat. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; **37**: 1009–19.

4 Dickstein Y, Lellouche J, Ben Dalak Amar M *et al.* Treatment outcomes of colistin- and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: an exploratory subgroup analysis of a randomized clinical trial. *Clin Infect Dis* 2019; **69**: 769–76.

- 5 Nigro SJ, Hall RM. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the *oxa23* carbapenemase gene. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1135–47.
- 6 Rodríguez CH, Balderrama Yarhui N, Nastro M *et al.* Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Med Microbiol* 2016; **65**: 1088–91.
- 7 Matos AP, Cayô R, Almeida LGP *et al.* Genetic characterization of plasmid-borne *bla*_{OXA-58} in distinct *Acinetobacter* species. *mSphere* 2019; **4**: e00376–19.
- 8 Chagas TP, Silveira MC, Albano RM *et al.* Draft genome sequence of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST15 (CC15) isolated from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; **110**: 691–2.
- 9 Rodríguez CH, Nastro M, Famiglietti A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Rev Argent Microbiol* 2018; **50**: 327–33.